

Acelerando o ganho genético e a rentabilidade: impacto do uso de touros Nelore precoces em sistemas de cria

Eliane Vianna da Costa-e-Silva¹, Malu Hodecker Sonvezzo², Gabriel Coelho Rosa³, Gustavo Guerino Macedo¹

¹ Docentes, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande -MS; ²Graduanda em Medicina Veterinária, Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC- UFMS, Campo Grande, MS; ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil
E-mail: eliane.silva@ufms.br

A eficiência reprodutiva e o ganho genético são determinantes na sustentabilidade de sistemas de cria em bovinos de corte. A seleção para precocidade sexual em machos Nelore (*Bos indicus*) reduz o intervalo de gerações e potencializa a produtividade. Objetivou-se avaliar o impacto econômico e genético do uso de touros Nelore superprecoces (SP) sob diferentes estratégias reprodutivas. Foi realizada simulação determinística e estocástica em rebanho de 1.200 matrizes, em estação reprodutiva. Considerou-se quatro cenários: Cenário 1: monta natural com touros maduros utilizados na proporção touro:vaca (PTV) de 1:30; Cenário 2: touros jovens selecionados por DEP-IPM (idade a puberdade do macho) e DEP-D (peso a desmama), PTV=1:25; Cenário 3: touros SP em monta natural (1:20); Cenário 4: touros SP em novilhas com 2 protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e vacas em 1 IATF (n=300) utilizando sêmen refrigerado de reprodutores SP seguido de repasse. Os cálculos econômicos foram baseados em valores do Cepea (MS, 15/04/2026), com preço do boi gordo de R\$ 367,30/@ e bezerro de R\$ 3.366,00/cabeça. Os cenários apresentaram diferenças progressivas quanto à eficiência produtiva e econômica. O sistema tradicional (cenário 1) apresentou taxa de prenhez (TP) de 80% e taxa de desmama (TD) de 72, com o Retorno sobre o Investimento (ROI) de 12–15% e ganho genético anual de 2%. O cenário com seleção intermediária (cenário 2) elevou a TP para 81–83% e TD=74-76%, ROI de 18–22% e ganho genético de 3–4%. O uso de touros SP (cenário 3) apresentou TP=82–85% e TD=78–82%, ROI de 28–32% e ganho genético de 4–6%. O cenário com intensificação tecnológica (cenário 4; SP + IATF) apresentou desempenho superior, com TP=85%, TD=80% e maior estabilidade produtiva, atingindo ROI de 32–36%, incremento superior a 120% em relação ao cenário 1 e aumento do valor presente líquido superior a 40%. O ganho econômico por bezerro variou entre R\$ 420,00 e R\$ 480,00 devido ao incremento de aproximadamente 33% no peso à desmama (180 vs 240 kg). Os resultados evidenciam que a intensificação tecnológica associada à seleção para precocidade promove redução do risco reprodutivo, aumento da eficiência biológica e aceleração do ganho genético, com efeito cumulativo sobre a rentabilidade. Conclui-se que a utilização de touros superprecoces associada à IATF constitui estratégia superior para sistemas de cria, promovendo maior eficiência produtiva, redução de perdas e maximização do retorno econômico e genético.

Palavras-chave: análise econômica, bovinos de corte, IATF, melhoramento genético, precocidade sexual.

Autorizações legais: CEUA/UFMS - protocolo 1287/2023

Agradecimentos e financiadores: À CAPES - Código Financeiro 001, UFMS e à FUNDECT (T.O. 129/2023 - FUNDECT 10/2022 - Mulheres na Ciência Sul-Mato-grossense).

Accelerating genetic gain and profitability: impact of early-maturing Nelore bulls in cow-calf systems.

Eliane Vianna da Costa-e-Silva¹, Malu Hodecker Sonvezzo², Gabriel Coelho Rosa³, Gustavo Guerino Macedo¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

²Undergraduate Research Fellow, UFMS; ³Graduate Program in Veterinary Sciences– UFMS

E-mail: eliane.silva@ufms.br

Reproductive efficiency and genetic gain are decisive in the sustainability of breeding systems in beef cattle. Selection for sexual precocity in males Nelore (*Bos indicus*) reduces the generation interval and enhances productivity. The objective was to evaluate the economic and genetic impact of using early maturing (EM) Nelore bulls under different reproductive strategies. A deterministic and stochastic simulation was carried out on a herd of 1200 cows. Four scenarios were considered: Scenario 1: natural breeding with mature bulls used in a bull:cow ratio (BCR) of 1:30; Scenario 2: young bulls selected by DEP-IPM (male age at puberty) and DEP-D (weaning weight), BCR=1:25; Scenario 3: EM bulls in natural breeding (1:20); Scenario 4: EM bulls in heifers with 2 fixed-time artificial insemination protocols (FTAI) and cows in 1 FTAI (n=300) with refrigerated semen from EM sires followed by transfer. The economic calculations were based on values from CEPEA (MS, 15/04/26), with a price for cattle of R\$ 367,30/@ and for calves of R\$ 3.366,00/head. The scenarios showed progressive differences in terms of productivity and economic efficiency. The traditional system (scenario 1) presented a pregnancy rate (PR) of 80%, weaning rate (WR) of 72%, with a Return on Investment (ROI) of 12–15% and annual genetic gain of 2%. The scenario with intermediate selection (scenario 2) increased PR to 81–83% and WR to 74–76%, ROI of 18–22% and genetic gain of 3–4%. The use of EM bulls (scenario 3) resulted in PR of 82–85%, and WR of 78–82%, ROI of 28–32% and genetic gain of 4–6%. The scenario with technological intensification (scenario 4; EM bulls + FTAI) presented superior performance, with PR close to 85%, WR=80% and greater production stability, reaching an ROI of 32–36%, an increase of more than 120% in relation to scenario 1 and an increase in net present value of more than 40%. The economic gain per calf varied between R\$420,00 and R\$480,00 due to the increase of approximately 33% in weaning weight (180 vs 240 kg). The results show that technological intensification associated with selection for precocity promotes a reduction in reproductive risk, an increase in biological efficiency and an acceleration of genetic gain, with a cumulative effect on profitability. It is concluded that the use of EM bulls associated with FTAI constitutes a superior strategy for breeding systems, promoting greater production efficiency, reducing losses and maximizing economic and genetic return.

Keywords: beef cattle, economic analysis, genetic improvement, sexual precocity.

Legal authorizations: Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFMS) - protocol 1287/2023

Acknowledgments and funders: To CAPES - Financial Code 001, UFMS and FUNDECT (T.O. 129/2023 - FUNDECT 10/2022 - Women in Science in South Mato Grosso).

Adenite vesicular em touro jovem da raça Nelore mantido em criação extensiva

Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Fernanda Baatsch Nascimento², Ana Laura Pasqualinotto¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes², Dallet Amorim Paes Almeida², Ellen Lara Miguel², Laura Nataly Garcia Oliveros², Carlos Eduardo Fidelis², Marcos Veiga dos Santos², Eneiva Carla Carvalho Celeghini²

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: thainara.rodrigues@usp.br

As afecções das glândulas sexuais anexas em touros comprometem a qualidade seminal, levando a diminuição do desempenho reprodutivo. Dentre essas, destaca-se a adenite vesicular também conhecida como vesiculite – inflamação que acomete as glândulas vesiculares uni ou bilateralmente – com prevalência variando de 1 a 10% nos rebanhos bovinos. O presente relato tem como objetivo reportar um caso de adenite vesicular em touro jovem da raça Nelore. O caso foi diagnosticado durante a avaliação andrológica, em um rebanho experimental contendo 126 animais, entre 15 e 18 meses de idade, mantidos em criação extensiva, divididos em dois piquetes de *Brachiaria Brizantha* e suplementação de manutenção com 0,4% do peso vivo e água *ad libitum*. Foram identificados neste rebanho dois animais (incidência de 1,56%) com presença de exsudato purulento no ejaculado, entretanto apenas um caso será relatado. O animal foi monitorado longitudinalmente dos 15 aos 18 meses de idade, sendo submetido a exames andrológicos mensais. Estes compreenderam a inspeção das glândulas sexuais acessórias por palpação e ultrassonografia transretal, colheita de sêmen (por eletroejaculação) e análise espermática (volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia). O sêmen também foi submetido à análise citológica em esfregaços corados (por Panótico Rápido) e exame microbiológico. Aos 15 meses de idade, o sêmen apresentou secreção purulenta, volume de 11 mL, concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL, motilidade de 10%, vigor 2,5 (1-5) e 68% de defeitos morfológicos. A citologia revelou intensa aglutinação celular, 4% de neutrófilos segmentados, 92,5% de linfócitos e 3,5% de células de descamação. Aos 16 meses, persistiu a secreção purulenta, com volume de 14 mL, concentração espermática de 60×10^6 espermatozoides/mL, com incremento da motilidade (55%), vigor 2 e a alta percentagem de defeitos morfológicos (49,5%). Na citologia, observou-se 17,5% de neutrófilos segmentados, 81,5 % de linfócitos e 1% de células de descamação. Aos 17 meses, o quadro purulento manteve-se com volume de 12 mL, concentração 320×10^6 espermatozoides/mL, motilidade de 70%, vigor 3,5 e 73,5% de defeitos totais. Aos 18 meses, ainda se observou secreção purulenta, volume de 14 mL, concentração de 305×10^6 espermatozoides/mL, motilidade de 45%, vigor 2 e 40,5% de defeitos totais. Na citologia 7,5% de neutrófilos segmentados, 91% de linfócitos e 1,5% de células de descamação. Nesta última etapa, detectou-se discreto aumento da glândula vesicular direita à palpação retal, sem alterações ultrassonográficas. O cultivo microbiológico isolou *Enterococcus faecalis* em duas colheitas, aos 15 e 16 meses de idade, sugerindo o diagnóstico de adenite vesicular com caráter agudo. Conclui-se que a adenite vesicular em touros jovens é frequentemente negligenciada devido à dificuldade de identificação sintomatológica, corroborando a falha de diagnósticos na rotina a campo de exames clínicos. Além disso, fatores como o comportamento de sodomia, facilitando uma infecção ascendente e outras infecções que podem liberar bactérias na corrente sanguínea, podem contribuir para a incidência desse processo. Portanto, o acompanhamento longitudinal, por meio de exames andrológicos associado ao uso de métodos complementares como citologia e microbiologia, são fundamentais para o diagnóstico preciso e adequado mapeamento dessa afecção em rebanhos.

Palavras-chave: inflamação, subfertilidade, citologia, microbiológico, glândulas vesiculares.

Autorizações legais: CEUA/FZEA-USP: protocolo no. 9249180123 e CEUA/FMVZ-USP n. 5265190525.

Agradecimentos e financiadores: A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2023/01059-0) pelo apoio financeiro.

Vesicular adenitis in a young Nelore bull maintained in extensive management

Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Fernanda Baatsch Nascimento², Ana Laura Pasqualinotto¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes², Dallet Amorim Paes Almeida², Ellen Lara Miguel², Laura Nataly Garcia Oliveros², Carlos Eduardo Fidelis², Marcos Veiga dos Santos², Eneiva Carla Carvalho Celeghini²

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: thainara.rodrigues@usp.br

Affections of the accessory sex glands in bulls compromise seminal quality, leading to a decrease in reproductive performance. Among these, vesicular adenitis also known as vesiculitis stands out –an inflammation affects the vesicular glands uni- or bilaterally – with prevalence ranging from 1 to 10% in cattle herds. The present report aims to report a case of vesicular adenitis in a young Nelore bull. The case was diagnosed during andrological evaluation, in an experimental herd containing 126 animals, between 15 and 18 months of age, maintained in extensive rearing, divided into two paddocks of *Brachiaria brizantha* and maintenance supplementation with 0.4% of body weight and water *ad libitum*. Two animals were identified in this herd (incidence of 1.56%) were identified with the presence of purulent exudate in the ejaculat. However, only one case will be reported. The animal was monitored longitudinally from 15 to 18 months of age, being submitted to monthly andrological examinations. These comprised the inspection of the accessory sex glands by palpation and transrectal ultrasonography, semen collection (by electroejaculation), and spermatic analysis (volume, concentration, motility, vigor, and morphology). The semen was also submitted to cytological analysis in stained smears (using Quick Panoptic) and microbiological examination. At 15 months of age, the semen presented purulent secretion, volume of 11 mL, concentration of 20×10^6 spermatozoa/mL, motility of 10%, vigor 2.5 (1-5), and 68% of morphological defects. Cytology revealed intense cellular agglutination, 4% segmented neutrophils, 92.5% lymphocytes, and 3.5% desquamation cells. At 16 months, the purulent secretion persisted, with a volume of 14 mL, sperm concentration of 60×10^6 spermatozoa/mL, with an increase in motility (55%), vigor of 2, and a high percentage of morphological defects (49.5%). In cytology, 17.5% segmented neutrophils, 81.5% lymphocytes, and 1% desquamation cells were observed. At 17 months, the purulent condition remained with a volume of 12 mL, concentration of 320×10^6 spermatozoa/mL, motility of 70%, vigor 3.5, and 73.5% of defects. At 18 months, purulent secretion was still observed, volume of 14 mL, concentration of 305×10^6 spermatozoa/mL, motility of 45%, vigor 2, and 40.5% of defects. In cytology, 7.5% segmented neutrophils, 91% lymphocytes, and 1.5% desquamation cells. In this last stage, a slight enlargement of the right vesicular gland was detected by rectal palpation, without ultrasonographic alterations. Microbiological culture isolated *Enterococcus faecalis* in two collections, at 15 and 16 months of age, suggesting the diagnosis of seminal vesicle with an acute character. It is concluded that vesicular adenitis in young bulls is often neglected due to the difficulty of symptomatology identification, corroborating the failure of diagnoses in the field routine of clinical examinations. Furthermore, factors such as sodomy behavior, facilitating an ascending infection, and other infections that can release bacteria into the bloodstream, may contribute to the incidence of this process. Therefore, longitudinal monitoring through andrological examinations associated with the use of complementary methods such as cytology and microbiology are fundamental for the precise diagnosis and adequate mapping of this affection in herds.

Keywords: subfertility, cytology, microbiological, inflammation, seminal vesicle.

Legal authorizations: CEUA/FZEA-USP: protocol no. 9249180123 and CEUA/FMVZ-USP n. 5265190525.

Acknowledgments and funders: The authors are grateful the São Paulo Research Foundation (FAPESP, nº 2023/01059-0) for financial support.

A espectroscopia FTIR do soro sanguíneo de machos Nelore jovens à desmama avalia a probabilidade de precocidade sexual futura?

Aline Aparecida de Souza Albuquerque^{*-1,5}, Malu Hodecker Sonvezzo^{2,5}, Marissa Prado³, Yessamin Costa³, Cícero Cena³, Luiz Carlos Cesar Filho⁴, Gustavo Guerino Macedo⁵, Eliane Vianna da Costa-e-Silva⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil; ²Graduanda em Medicina Veterinária, Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC- UFMS, Campo Grande, MS; ³Laboratório de ótica e fotônica - SISFOTON/INFI-UFMS, Campo Grande, MS; ⁴Procriar; ⁵Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
E-mail: eliane.silva@ufms.br

A precocidade sexual é relevante para a eficiência reprodutiva em bovinos de corte, sua identificação precoce pode acelerar ganhos genéticos e tornar a seleção mais economicamente viável. Este estudo avaliou o potencial da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) como ferramenta preditiva não invasiva para discriminar precocidade sexual em bezerras Nelore, utilizando soro sanguíneo coletado à desmama. Amostras foram acondicionadas em gelo seco a 5°C para transporte, centrifugadas a 2000rpm/10 min, armazenadas em duplicatas de 1ml e mantidas a -20 °C em ultrafreezer. Os animais (n=39) foram classificados de acordo com a idade à puberdade em superprecoces, púberes até os 14 meses, n=11, 13,24±0,64m; precoces, entre 14-17m, n=11, 15,27±0,76m; e tradicionais, 17m, n=17, 21,35±1,53m. As análises foram feitas por FTIR nas regiões espectrais de 3800–1000, 3000–1000 e 1800–1000 cm⁻¹. A análise exploratória foi conduzida por análise de componentes principais (PCA), e a classificação supervisionada por Support Vector Machine (SVM) e Random Forest (RF), testando diferentes números de componentes principais, kernels (linear, quadrático e cúbico) e hiperparâmetros C (1, 10 e 100). O treinamento foi realizado por *leave-one-out cross-validation*. A PCA não evidenciou separação entre grupos em nenhuma região espectral, com sobreposição dos escores. Na região de 3800–1000 cm⁻¹, o PC1 explicou 86,6% da variância total, porém os gráficos de escores mostraram pontos completamente sobrepostos entre os três grupos. Nas regiões de 3000–1000 e 1800–1000 cm⁻¹, a variância explicada foi menor (34,0–35,0% para PC1 e 18,2–21,0% para PC2), reforçando a ausência de estrutura discriminante nos dados. Os modelos SVM apresentaram acurácia máxima de 46,8% na validação (região 3800–1000 cm⁻¹), reduzindo para 39,7% no teste. Nas demais regiões, as acurácias variaram entre 38,9% e 40,5% na validação, e 36,5% a 40,5% no teste. Nenhuma combinação de kernel ou hiperparâmetro C resultou em desempenho satisfatório. O melhor modelo RF alcançou 47,6% de acurácia na validação (região 3000–1000 cm⁻¹ com 100 árvores e 1 PC), porém apenas 36,5% no teste. A classe T apresentou a maior acurácia individual (57,1%), possivelmente por ser o grupo mais numeroso, os demais apresentaram acurácia entre 39,7% e 40,5% na validação. Ambos os algoritmos apresentaram desempenho equivalente e insatisfatório. Os valores de acurácia de validação variaram de 38,9% a 47,6%, enquanto a acurácia de teste variou entre 36,5% e 40,5%. Considerando que a acurácia esperada ao acaso para 3 classes é 33,3%, os melhores modelos obtiveram apenas uma melhoria marginal de ~14%. Os espectros FTIR médios mostraram sobreposição visual completa nas regiões analisadas. As principais bandas identificadas incluem: região de O-H e N-H (3200 cm⁻¹), bandas de C-H (2900 cm⁻¹), amida I (1650 cm⁻¹), amida II (1540 cm⁻¹) e região de *fingerprint* (1200–1000 cm⁻¹). A ausência de diferenças visuais significativas entre classe sugere que não há variações composicionais substanciais no soro sanguíneo passíveis de discriminar a precocidade sexual à desmama utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho. A ausência de sinal preditivo pode ser explicada por fatores biológicos e técnicos. A puberdade é um processo complexo regulado por eixos hormonais que se ativam progressivamente. À desmama, as diferenças metabólicas associadas à precocidade podem ser sutis ou inexistentes. A FTIR detecta principalmente proteínas, lipídios e carboidratos, marcadores não hormonais específicos que diferenciariam os grupos futuramente. Nas condições deste estudo, a espectroscopia FTIR não foi eficaz na discriminação da precocidade sexual futura. Não foram identificadas regiões espectrais específicas capazes de discriminar os grupos avaliados. Os resultados sugerem que as alterações metabólicas associadas à puberdade ainda não estão estabelecidas ou não são detectáveis por essa abordagem analítica nessa fase.

Palavras-chave: biomarcadores, espectroscopia óptica, puberdade, touros, zebu.

Autorizações legais: CEUA/UFMS - protocolo 1287/2023.

Agradecimentos e financiadores: À CAPES - Código Financeiro 001, UFMS e FUNDECT (T.O. 129/2023 - FUNDECT 10/2022 - Mulheres na Ciência), Genética Aditiva, Procriar, Laboratório de ótica e fotônica - SISFOTON/INFI-UFMS.

Does FTIR spectroscopy of blood serum from young Nellore males at weaning assess the probability of future sexual precocity?

Aline Aparecida de Souza Albuquerque^{*1,5}, Malu Hodecker Sonvezzo^{2,5}, Marissa Prado³, Yessamin Costa³, Cícero Cena³, Fernanda Battistotti Barbosa⁴, Luiz Carlos Cesar Costa Filho⁴, Gustavo Guerino Macedo⁵, Eliane Vianna da Costa-e-Silva⁵

¹Graduate Program in Veterinary Sciences– UFMS; ² Undergraduate Research Fellow, UFMS; ³ Optics and Photonics Laboratory - SISFOTON/INFI-UFMS; ⁴ Procriar; ⁵ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil
E-mail: eliane.silva@ufms.br

Sexual precocity is a relevant trait for reproductive efficiency in beef cattle, and its early identification may accelerate genetic gains and improve economic selection. This study evaluated the potential of Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy as a non-invasive predictive tool to predict sexual precocity in Nellore calves (*Bos indicus*), using serum samples collected at weaning. The animals were classified according to age at puberty as SP – pubescent up to 14 months, P – between 14 -17 m and T >17 m. A total of 39 males were classified as early maturing (EM, n=11, 13.24 ± 0.64 months), precocious (P, n=11, 15.27 ± 0.76 months) and traditional (T, n=17, 21.35 ± 1.53 months). Blood samples were obtained from weaning (between 6 and 7 m of age) through the jugular vein, using a 25x8mm needle and vacuum tubes, packed in a Styrofoam box with dry ice at 5°C for transport, and subsequently centrifuged at 2000rpm/10 min. Aliquots of 1 ml were packaged in duplicate in Eppendorf and kept at -20 °C in an ultrafreezer. Serum samples were analyzed by FTIR in three spectral regions: 3800–1000, 3000–1000, and 1800–1000 cm⁻¹. Exploratory analysis was performed using Principal Component Analysis (PCA), while supervised classification was conducted using Support Vector Machine (SVM) and Random Forest (RF), testing different numbers of principal components, linear, quadratic, and cubic kernels, and hyperparameter C values (1, 10, and 100). Validation was performed using leave-one-out cross-validation (LOOCV). PCA did not show separation among groups in any spectral region, with complete overlap of score plots. In the 3800–1000 cm⁻¹ region, PC1 explained 86.6% of the total variance; however, scores overlapped among groups. In the 3000–1000 and 1800–1000 cm⁻¹ regions, explained variance was lower (34.0–35.0% for PC1 and 18.2–21.0% for PC2), reinforcing the absence of discriminant structure in the data. SVM models achieved a maximum accuracy of 46.8% in validation, decreasing to 39.7% in testing, indicating overfitting. In the remaining regions, accuracy ranged from 38.9% to 40.5% in validation and 36.5% to 40.5% in testing. No combination of kernel or hyperparameter C resulted in satisfactory performance. The best RF model reached 47.6% accuracy in validation but only 36.5% in testing, also indicating overfitting. Both algorithms showed equivalent and unsatisfactory performance. Validation accuracy ranged from 38.9% to 47.6%, while test accuracy ranged from 36.5% to 40.5%. Considering that the expected random accuracy for three classes is 33.3%, the best models achieved only marginal improvement (~14%). Mean FTIR spectra showed complete overlap among groups across all analyzed regions. The main bands identified included O–H and N–H (3200 cm⁻¹), C–H (2900 cm⁻¹), amide I (1650 cm⁻¹), amide II (1540 cm⁻¹), and the fingerprint region (1200–1000 cm⁻¹). The absence of significant differences suggests no substantial compositional variation in serum capable of predicting sexual precocity at weaning using FTIR. The lack of predictive signal may be explained by biological and technical factors. Puberty is a complex process regulated by progressively activated hormonal axes. At weaning, metabolic differences associated with sexual precocity may be subtle or absent. FTIR primarily detects proteins, lipids, and carbohydrates rather than specific hormonal markers. Under these conditions, FTIR spectroscopy applied to serum was not effective in predicting future sexual precocity. No specific spectral regions with predictive capability were identified. These findings suggest that metabolic changes associated with puberty are not yet established or not detectable at this developmental stage.

Keywords: biomarkers, optical spectroscopy, puberty, bulls, zebu

Legal authorizations: CEUA/UFMS – protocol 1287/2023

Acknowledgments and funders: CAPES, code 001. FUNDECT -T.O. 129/2023 - Edital 10/2022 - Mulheres na Ciência Sul-Mato-grossense, Genética Aditiva, Procriar, Optics and Photonics Laboratory - SISFOTON/UFMS

Alterações funcionais do proteoma espermático de touros, associadas à criopreservação

Paulina Betancur Guerra¹, Yasmin El Hayek Martins¹, Ramon Alves da Cunha¹, Larysse Aparecida Alves¹, André Maciel Crespilho², Elisa Giaretta³, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Central Bela Vista, ³Università degli Studi di Padova
E-mail: pb.guerra@unesp.br

Este estudo objetivou caracterizar as alterações funcionais do proteoma espermático (fresco vs. congelado) de touros Nelore, associadas à criopreservação. Dez ejaculados foram colhidos com vagina artificial, analisados quanto a cinemática espermática, criopreservados e preparados para espectrometria de massas utilizando a abordagem *shotgun* (nLC-ESI Orbitrap MS/MS). Os dados foram normalizados e submetidos análise estatística multivariada (PCA, PLS-DA, VIP score), univariada (teste-t) caracterização funcional de enriquecimento de vias metabólicas (KEGG), interações proteína-proteína (STRING). Foram identificadas 1.054 proteínas, sendo 933 nos espermatozoides frescos e 836 nos descongelados. A criopreservação promoveu alterações no proteoma espermático, com redução do número de proteínas associadas as vias proteassoma, complexo responsável pela degradação seletiva de proteínas, composto por uma unidade central catalítica (20S) e subunidades regulatórias (19S) nos espermatozoides descongelados em relação ao fresco. A rede de interação proteína-proteína evidenciou maior complexidade no sêmen fresco, em comparação ao descongelado sugerindo perda de conectividade funcional após a criopreservação. Além disso, 5 principais *clusters* foram conservados nas duas condições, e os espermatozoides frescos apresentaram 8 *clusters* exclusivos, associados aos processos de regulação celular (PRKAR1B, PRKAR1A), organização estrutural (CCDC151, TTC25) e sinalização (AK8, AK9); enquanto os descongelados apresentaram 8 *clusters* exclusivos associados as vias metabólicas (DLAT, ACAT1, SUCLG1, PDHX, DLD, MDH2, ENTPD1, AK9, NME8), função mitocondrial (MPC2, MPC1L) e mecanismos de manutenção do estado redox (*superoxide dismutase* [Cu-Zn], PARK7). Esses achados indicam que a criopreservação promove uma reorganização funcional do proteoma espermático, caracterizada pela redução de redes associadas à motilidade, redirecionamento para vias de resposta ao estresse oxidativo e diminuição de componentes do proteassoma, comprometendo os mecanismos de controle de qualidade proteica, incluindo a remoção e o reparo de proteínas danificadas, resultando em prejuízo da funcionalidade espermática.

Palavras-chave: bovino, congelação, espermatozoide, estresse-oxidativo, proteômica.

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo CEUA da FMVZ-UNESP/Botucatu (protocolo nº 000.192/2024), seguindo as normas éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Agradecimentos e financiadores: ao CNPq (Processo No. 140252/2026-6) e à CAPES (código de financiamento 001).

Functional alterations in the sperm proteome of bulls, associated with cryopreservation

Paulina Betancur Guerra¹, Yasmin El Hayek Martins¹, Ramon Alves da Cunha¹, Larysse Aparecida Alves¹, André Maciel Crespilho², Elisa Giaretta³, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Central Bela Vista, ³Università degli Studi di Padova
E-mail: pb.guerra@unesp.br

This study aimed to characterize the functional alterations of the sperm proteome (fresh vs. frozen) of Nelore bulls associated with cryopreservation. Ten ejaculates were collected using an artificial vagina, analyzed for sperm kinematics, cryopreserved, and prepared for mass spectrometry using the shotgun approach (nLC-ESI Orbitrap MS/MS). The data were normalized and subjected to multivariate statistical analysis (PCA, PLS-DA, VIP score), univariate analysis (t-test), functional characterization by metabolic pathway enrichment (KEGG), and protein–protein interaction analysis (STRING). A total of 1,054 proteins were identified, with 933 in fresh spermatozoa and 836 in frozen-thawed samples. Cryopreservation promoted alterations in the sperm proteome, with a reduction in the number of proteins associated with proteasome pathways, a complex responsible for selective protein degradation, composed of a central catalytic unit (20S) and regulatory subunits (19S), in frozen-thawed spermatozoa compared to fresh ones. The protein–protein interaction network showed greater complexity in fresh semen compared to frozen-thawed, suggesting a loss of functional connectivity after cryopreservation. In addition, five main clusters were conserved in both conditions, and fresh spermatozoa presented eight exclusive clusters associated with cellular regulation processes (PRKAR1B, PRKAR1A), structural organization (CCDC151, TTC25), and signaling (AK8, AK9); whereas frozen-thawed spermatozoa presented eight exclusive clusters associated with metabolic pathways (DLAT, ACAT1, SUCLG1, PDHX, DLD, MDH2, ENTPD1, AK9, NME8), mitochondrial function (MPC2, MPC1L), and redox state maintenance mechanisms (superoxide dismutase [Cu-Zn], PARK7). These findings indicate that cryopreservation promotes a functional reorganization of the sperm proteome, characterized by the reduction of networks associated with motility, redirection to oxidative stress response pathways, and a decrease in proteasome components, compromising protein quality control mechanisms, including the removal and repair of damaged proteins, resulting in impaired sperm functionality.

Keywords: bovine, freezing, oxidative-stress, proteomics, sperm.

Legal authorizations: The study was approved by the CEUA of FMVZ-UNESP/Botucatu (protocol no. 000.192/2024), following the ethical standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Acknowledgments and funders: CNPq (Process No. 140252/2026-6) and CAPES (financial code 001).

Andrologia Preditiva: O Futuro da Inseminação em *Data Lake* e Redes Neurais

Pedro Nacib Jorge-Neto^{1,2}, Leticia Alecho Requena Jorge^{2,3}, Diego Alecho Requena³

¹Universidade de São Paulo, ²Instituto Reprocon, ³Novagen Genética

E-mail: pepovet@gmail.com

A transição da andrologia clássica para a Andrologia Preditiva exige uma mudança de paradigma nas centrais de biotecnologia reprodutiva, superando não apenas a avaliação seminal puramente descritiva, mas também a crônica fragmentação de dados processados em softwares isolados e sem intercomunicação. A adoção de Inteligência Artificial (IA) na indústria da inseminação artificial ainda é incipiente, primordialmente devido à inconsistência e à desestruturação dos dados. A crescente demanda por máxima eficiência na inseminação artificial de espécies de interesse zootécnico, como bovinos (*Bos taurus*), bubalinos (*Bubalus bubalis*) e suínos (*Sus scrofa domesticus*), evidencia a necessidade urgente de uma rastreabilidade holística e integrada. Atualmente, a predição da congelabilidade seminal baseia-se de forma expressiva na avaliação subjetiva do operador, que infere a viabilidade a partir de eventos isolados. Em contrapartida, quando a rede neural profunda analisa milhares de variáveis simultaneamente integrando cinemática, morfologia e ambiência, possibilita a identificação da correlação matemática exata para prever esse desfecho. Nesse contexto, apresenta-se um ecossistema tecnológico digital fundamentado na plataforma de gestão ReproSense, já implantada na rotina operacional da central Novagen. Seu principal diferencial é a coleta de dados de forma padronizada, atrelada à integração multivariada interpretável (*interpretable multi-modal data integration*). Integrado a esta plataforma, encontra-se em desenvolvimento o módulo de Inteligência Artificial DeepRepro. O objetivo deste trabalho é apresentar um modelo estrutural embasado em IA para a captura e correlação de dados do fluxo andrológico, visando ampliar a capacidade analítica e preditiva do processamento seminal. A metodologia computacional foi desenhada para a coleta padronizada de parâmetros cinéticos e morfológicos das células espermáticas a fresco e pós-descongelamento, integrados sistemicamente a variáveis de ambiência e meteorologia, prevendo-se, em etapas subsequentes, o uso de visão computacional para o mapeamento etológico de reprodutores em tempo real. O modelo estrutura a captação de parâmetros em nível celular e todo o fluxo de dados é ingerido em um *data lake*, compondo a base unificada para o treinamento de redes neurais profundas. Como resultados e prova de conceito, o módulo DeepRepro utilizou mais de 100 ejaculados de búfalos previamente processados para o treinamento e parametrização inicial do algoritmo, demonstrando viabilidade do modelo em prever antecipadamente doses que seriam potencialmente rejeitadas no controle de qualidade pós-descongelamento. Essa predição fundamentou-se no cruzamento de dados de cinética espermática e variáveis climáticas/ambientais coletadas no momento do processamento e pós-descongelamento, bem como no retrospecto de partidas reprovadas. Ressalta-se, contudo, que este volume amostral representa apenas o estágio inicial de validação. Para o algoritmo atingir alta acurácia preditiva comercial e evitar o sobreajuste (*overfitting*), será necessária a ingestão contínua de milhares de ejaculados no *data lake*, contemplando múltiplas sazonalidades e variações. Adicionalmente, o projeto evidencia que o conhecimento técnico-científico humano se torna insubstituível na análise destes resultados. Como a rede inicia seu aprendizado identificando padrões matemáticos brutos sujeita a deduzir correlações espúrias sem causalidade biológica, a validação do andrologista é fundamental para discernir variáveis com sentido etológico de meros ruídos estatísticos. Conclui-se que a adoção de infraestruturas de *data lake* e redes neurais poderá redefinir a andrologia moderna, viabilizando tomadas de decisão antecipadas, otimizando a produção de doses inseminantes com maior potencial de fertilidade e impulsionando significativamente os resultados econômicos da inseminação artificial.

Palavras-chave: inteligência artificial, rastreabilidade, avaliação seminal, deep learning, cinética espermática.

Autorizações legais: Não se aplica, por tratar-se de estudo metodológico em arquitetura de software e análise de dados retrospectivos de rotina.

Agradecimentos e financiadores: Não se aplica.

Predictive Andrology: The Future of Insemination in Data Lake and Neural Networks

Pedro Nacib Jorge-Neto^{1,2}, Letícia Alecho Requena Jorge^{2,3}, Diego Alecho Requena³

¹Universidade de São Paulo, ²Instituto Reprocon, ³Novagen Genética

E-mail: pepovet@gmail.com

The transition from classical andrology to Predictive Andrology demands a paradigm shift in reproductive biotechnology centers, overcoming not only purely descriptive seminal evaluation but also the chronic fragmentation of data processed in isolated software without intercommunication. The adoption of Artificial Intelligence (AI) in the artificial insemination industry remains incipient, primarily due to data inconsistency and lack of structuring. The growing demand for maximum efficiency in the artificial insemination of livestock species, such as bovines (*Bos taurus*), water buffaloes (*Bubalus bubalis*), and swine (*Sus scrofa domestica*), highlights the urgent need for holistic and integrated traceability. Currently, predicting seminal freezability relies heavily on the operator's subjective assessment, inferring viability from isolated events. In contrast, when the deep neural network analyzes thousands of variables simultaneously—integrating kinematics, morphology, and environment—it enables the identification of the exact mathematical correlation to predict this outcome. In this context, a digital technological ecosystem is presented, based on the ReproSense management platform, already implemented in the operational routine of the Novagen center. Its main differentiator is standardized data collection, linked to interpretable multi-modal data integration. Integrated into this platform is the Artificial Intelligence module DeepRepro, currently under development. The objective of this work is to present a structural model based on AI for the capture and correlation of andrological workflow data, aiming to expand the analytical and predictive capacity of seminal processing. The computational methodology was designed for the standardized collection of kinetic and morphological parameters of fresh and post-thawed sperm cells, systemically integrated with environmental and meteorological variables, anticipating, in subsequent stages, the use of computer vision for real-time ethological mapping of sires. The model structures parameter capture at the cellular level, and the entire data flow is ingested into a data lake, establishing the unified foundation for training deep neural networks. As results and proof of concept, the DeepRepro module conducted preliminary validations with over 100 previously processed water buffalo ejaculates, demonstrating the model's viability in predicting in advance doses that would potentially be rejected in the post-thaw quality control. This prediction was based on the cross-referencing of sperm kinetics data and climatic/environmental variables collected at the time of processing and post-thawing, as well as the history of rejected batches. It is crucial to emphasize, however, that this sample size represents only the initial validation stage. For the algorithm to achieve high commercial predictive accuracy and avoid overfitting, the continuous ingestion of thousands of ejaculates into the data lake will be necessary, encompassing multiple seasonalities and variations. Additionally, the project highlights that human scientific expertise becomes irreplaceable in the analysis of these results. Since the network begins its learning by identifying raw mathematical patterns—susceptible to deducing spurious correlations without biological causality—the andrologist's validation is fundamental to discern variables with ethological sense from mere statistical noise. It is concluded that the adoption of data lake infrastructures and neural networks may redefine modern andrology, enabling anticipatory decision-making, optimizing the production of inseminating doses with greater fertility potential, and significantly boosting the economic outcomes of artificial insemination.

Keywords: artificial intelligence, traceability, seminal evaluation, deep learning, sperm kinetics.

Legal authorizations: Not applicable, as it is a methodological study on software architecture and retrospective analysis of routine data.

Acknowledgments and funders: Not applicable.

Avaliação da hemodinâmica testicular de touros nelore e sua relação com a qualidade seminal

Ricardo Araújo Micai¹, Neimar Corrêa Severo², Larissa Nunes Oliveira¹, Thaeny Laware Purificação Ribeiro³, Renata Lançon³

¹ABS, ²NCSevero Serviços Ltda, ³Universidade Federal de Uberlândia
E-mail: ricardo.micai@genusplc.com

As funções dos aparelhos de ultrassom atuais permitem avaliar no modo doppler a hemodinâmica com o índice de pulsatilidade (IP) e o índice de resistividade (IR) do fluxo de sangue nos testículos e glândulas sexuais acessórias para obter informações que possam ser relacionadas a avaliação do sêmen e auxiliar no diagnóstico precoce de possíveis afecções. O objetivo deste trabalho foi avaliar o parênquima testicular (modo B), a hemodinâmica testicular (doppler IP e IR) e a relação dessas avaliações com a qualidade seminal de touros nelore. Para isso, foram avaliados os dados ultrassonográficos no modo B convencional, onde as características principais foram parênquima (escala de 1 – 4), sendo 1- homogêneo sem pontos hiperecóticos, 2- homogêneo com pontos hiperecóticos, 3- heterogêneo sem pontos hiperecóticos e 4- heterogêneo com pontos hiperecóticos, sendo que quanto maior o número mais distante da normalidade. O mediastino foi classificado na escala de (1 - 2), sendo 1- normal sem alterações e 2- dilatado fora do padrão normal. Os dados de perímetro escrotal (PE) também foram levados em consideração no momento do exame. Foram avaliados 13 touros de idades variadas da raça nelore no momento pós-coleta de sêmen, durante os meses de novembro de 2025 a março de 2026 com o equipamento ultrassom modelo Sonoscape E2V® Pro. Após as avaliações ultrassonográficas, as características seminais dos touros foram avaliadas 60 dias após, totalizando 5 análises por touro, permitindo verificar a relação entre as avaliações ultrassonográficas e os parâmetros de qualidade seminal de cada touro. Todas as colheitas foram realizadas com vagina artificial. Sendo assim, foram avaliados volume seminal, motilidade inicial e motilidade pós-descongelamento (CASA), concentração espermática (espectofotômetro), morfologia espermática (microscopia de contraste de fase) e número de doses congeladas. Foi realizada análise dos dados por meio do PROC UNIVARIATE, com obtenção de estatísticas descritivas e verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Considerando 61 observações, foram obtidas médias de $6,07 \pm 0,34$ mL para volume seminal, $76,77 \pm 1,60\%$ para motilidade inicial, $1276,13 \pm 94,71$ para concentração espermática, $0,77 \pm 0,07\%$ para defeitos maiores, $3,52 \pm 0,28\%$ para defeitos menores e $4,30 \pm 0,32\%$ para defeitos totais. Posteriormente, as variáveis volume seminal, motilidade inicial, concentração espermática, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e motilidade pós-descongelamento foram avaliadas por modelos lineares mistos, considerando parênquima e mediastino, índice de resistividade (RI) e índice de pulsatilidade (PI) como efeitos fixos, e o touro como efeito aleatório. Não foram observados efeitos significativos dessas variáveis ultrassonográficas sobre volume, concentração, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e motilidade pós-descongelamento ($p > 0,05$). Para motilidade inicial, RI e PI apresentaram tendência estatística ($p = 0,0854$ e $p = 0,0723$, respectivamente). Para número de doses, observou-se elevada variabilidade entre os animais; ainda assim, o PI apresentou efeito significativo ($p = 0,033$), destacando-se como a variável mais consistentemente associada à capacidade de produção de doses, enquanto os demais preditores não evidenciaram associação relevante. Assim, conclui-se que as variáveis ultrassonográficas não influenciaram significativamente as características seminais avaliadas, embora o PI tenha se destacado como variável potencialmente relacionada ao número de doses, achado que merece investigação em estudos com maior poder amostral.

Palavras-chave: avaliação espermática, bovino, doppler, ultrassom.

Autorizações legais: CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado sob protocolo número 23117.030577/2025-09.

Agradecimentos e financiadores: CAPES

Evaluation of testicular hemodynamics in Nelore bulls and its relationship with semen quality

Ricardo Araújo Micai¹, Neimar Corrêa Severo², Larissa Nunes Oliveira¹, Thaeny Laware Purificação Ribeiro³, Renata Lançon³

¹ABS, ²NCSevero Serviços Ltda³, Universidade Federal de Uberlândia
 E-mail: ricardo.micai@genusplc.com

The functions of current ultrasound equipment allow Doppler-mode assessment of hemodynamics through the pulsatility index (PI) and resistive index (RI) of blood flow in the testicles and accessory sex glands, providing information that may be related to semen evaluation and assist in the early diagnosis of potential disorders. The aim of this study was to evaluate testicular parenchyma (B-mode), testicular hemodynamics (Doppler PI and RI), and the relationship between these assessments and semen quality in Nelore bulls. For this purpose, conventional B-mode ultrasonographic data were evaluated, with the main characteristic being parenchyma, classified on a 1 to 4 scale: 1 = homogeneous without hyperechoic spots, 2 = homogeneous with hyperechoic spots, 3 = heterogeneous without hyperechoic spots, and 4 = heterogeneous with hyperechoic spots, with higher scores indicating greater deviation from normality. The mediastinum was classified on a 1 to 2 scale: 1 = normal, without alterations, and 2 = dilated, outside the normal pattern. Scrotal circumference (SC) data were also considered at the time of examination. Thirteen Nelore bulls of different ages were evaluated after semen collection between November 2025 and March 2026 using a Sonoscape E2V® Pro ultrasound device. Following ultrasonographic evaluation, semen characteristics were assessed 60 days later, totaling five analyses per bull, allowing the relationship between ultrasonographic findings and semen quality parameters of each bull to be investigated. All semen collections were performed using an artificial vagina. The following parameters were evaluated: semen volume, initial motility and post-thaw motility (CASA), sperm concentration (spectrophotometer), sperm morphology (phase-contrast microscopy), and number of frozen doses. Data analysis was performed using PROC UNIVARIATE to obtain descriptive statistics and assess normality using the Shapiro–Wilk test. Considering 61 observations, mean values of 6.07 ± 0.34 mL for semen volume, $76.77 \pm 1.60\%$ for initial motility, 1276.13 ± 94.71 for sperm concentration, $0.77 \pm 0.07\%$ for major defects, $3.52 \pm 0.28\%$ for minor defects, and $4.30 \pm 0.32\%$ for total defects were obtained. Subsequently, semen volume, initial motility, sperm concentration, major defects, minor defects, total defects, and post-thaw motility were analyzed using linear mixed models, considering parenchyma and mediastinum, resistive index (RI), and pulsatility index (PI) as fixed effects, and bull as a random effect. No significant effects of these ultrasonographic variables were observed on volume, concentration, major defects, minor defects, total defects, or post-thaw motility ($p > 0.05$). For initial motility, RI and PI showed a statistical trend ($p = 0.0854$ and $p = 0.0723$, respectively). For the number of doses, high variability among animals was observed; nevertheless, PI showed a significant effect ($p = 0.033$), standing out as the variable most consistently associated with dose production capacity, while the other predictors did not show relevant associations. Thus, it can be concluded that the ultrasonographic variables did not significantly influence the evaluated semen characteristics, although PI emerged as a variable potentially related to the number of doses, a finding that warrants further investigation in studies with greater statistical power.

Keywords: cattle, doppler, sperm evaluation, ultrasound.

Legal authorizations: CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado sob protocolo número 23117.030577/2025-09.

Acknowledgments and funders: CAPES

Características ecogênicas testiculares e índices velocimétricos da artéria supratesticular de touros jovens Nelore e Canchim em diferentes estágios reprodutivos

Joedson Dantas Gonçalves^{1,2}, Maria Emilia Franco Oliveira³, Rubens Paes de Arruda⁴, Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Livia Ferreira Pinho¹, Alexandre Rossetto Garcia^{1,2}

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Universidade Estadual Paulista, ⁴Universidade de São Paulo
E-mail: joedson1dantas@gmail.com

A ultrassonografia vem sendo utilizada em estudos reprodutivos com touros para detectar marcadores de puberdade. Nesse sentido, avaliações ecogênicas e de hemodinâmica testicular podem fornecer informações importantes sobre o estágio puberal. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar as características ecogênicas testiculares e os índices velocimétricos da artéria supratesticular de touros jovens em diferentes estágios reprodutivos. Foram utilizados 46 touros: 22 Nelore (*Bos indicus*; 7,6±0,1 meses; 206,4±4,2 kg) e 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*; 8,9±0,1 meses; 228,9±8,6 kg), mantidos em 24 ha de pastejo rotacionado com *Urochloa brizantha* cv. Piatã, com acesso *ad libitum* à mistura mineral e água. As avaliações ultrassonográficas e seminais foram realizadas por 12 meses consecutivos, e os dados organizados em três momentos: 1º ejaculado, início da puberdade e fase pós-puberal (Nelore: 14,0±0,6; 16,2±0,3; 19,5±0,2 meses; Canchim: 13,1±0,5; 15,2±0,5; 20,0±0,1 meses). O sêmen foi colhido mensalmente por eletroejaculação e o início da puberdade foi determinado ≤50 milhões de espermatozoides totais e 10% de motilidade progressiva subjetiva foram observados no ejaculado. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em modo B (7,5 MHz) e Doppler espectral, utilizando equipamento Z60 Vet® com transdutor linear (5,0–8,0 MHz). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em cortes longitudinais, sendo selecionados três frames de cada animal em cada timepoint para análise no software Image Pro Plus 7.0™ para determinação da ecogenicidade (média dos pixels) e heterogeneidade (desvio padrão) utilizando escala de cinza de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto). A hemodinâmica da artéria supratesticular foi avaliada pelos índices de pulsatilidade (PI) e resistividade (RI). Para as análises, foram consideradas as médias dos testículos esquerdo e direito. As análises estatísticas foram realizadas separadamente para as raças, considerando as três fases reprodutivas (timepoints), por ANOVA em modelo misto, seguida do teste de Tukey (P<0,05), utilizando o software R (R Core Team, 2023). Para a raça Nelore, não houve diferença na ecogenicidade e na heterogeneidade do parênquima testicular (P=0,70 e P=0,40) entre o 1º ejaculado (68,4±3,2 e 13,0±0,4), o início da puberdade (70,9±3,4 e 13,2±0,4) e a pós-puberdade (66,9±3,2 e 12,5±0,4). Para a raça Canchim, houve diferença na ecogenicidade do parênquima testicular (P=0,04), com valores no 1º ejaculado (80,0±4,2^{ab}) semelhantes ao início da puberdade (83,0±4,4a), mas superiores à pós-puberdade (71,5±4,2b). Para a heterogeneidade do parênquima (P=0,01), os valores no 1º ejaculado (13,8±0,4a) foram semelhantes aos do início da puberdade (13,5±0,4^{ab}), mas superiores aos da pós-puberdade (12,6±0,4b). Para o PI nos touros Nelore, houve diferença (P=0,01), com maior valor no 1º ejaculado (0,8±0,04a), não diferindo do início da puberdade (0,7±0,04^{ab}), e menor valor na pós-puberdade (0,6±0,04b). O mesmo padrão foi observado para o RI (P=0,005), com valores de 0,6±0,02a, 0,5±0,02^{ab} e 0,5±0,02b para o 1º ejaculado, início da puberdade e pós-puberdade, respectivamente. Para a raça Canchim, não houve diferença para PI e RI, com valores de PI (0,7±0,05; 0,7±0,05; 0,7±0,05; P=0,98) e RI (0,5±0,02; 0,5±0,02; 0,5±0,02; P=0,90) para o 1º ejaculado, início da puberdade e pós-puberdade, respectivamente. Maiores valores ecogênicos nas fases iniciais podem estar associados à menor maturidade estrutural dos túbulos seminíferos, devido à menor presença de fluidos no interstício, alterando a ecogenicidade e heterogeneidade. Já a redução de PI e RI na fase pós-puberal indica menor resistência vascular e maior perfusão, podendo favorecer a espermatogênese. De forma geral, os parâmetros ecogênicos e hemodinâmicos testiculares variaram conforme a fase reprodutiva, porém de modo distinto em cada raça. Esses achados indicam que as mudanças ao longo do desenvolvimento reprodutivo dependem do genótipo do touro.

Palavras-chave: andrologia animal, ultrassonografia, hemodinâmica testicular, bovinos.

Autorizações legais: Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA/Embrapa Pecuária Sudeste: PR02/2023.

Agradecimentos e financiadores: À FAPESP (Processo 2021/04335-3) e ao CNPq (Processos 312295/2022-7; 402044/2025-8; 150335/2025-3; 150199/2026-0).

Testicular echogenic characteristics and velocimetric indices of the suprastesticular artery in young Nelore and Canchim bulls at different reproductive stages

Joedson Dantas Gonçalves^{1,2}, Maria Emilia Franco Oliveira³, Rubens Paes de Arruda⁴, Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Livia Ferreira Pinho¹, Alexandre Rossetto Garcia^{1,2}

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Universidade Estadual Paulista, ⁴Universidade de São Paulo
E-mail: joedson1dantas@gmail.com

Ultrasound has been used in reproductive studies with bulls to detect pubertal markers. In this sense, echogenic and hemodynamic evaluations can provide important information about the pubertal stage. This study aimed to evaluate the testicular echogenic characteristics and velocimetric indices of the suprastesticular artery in young bulls at different reproductive stages. Forty-six bulls were used: 22 Nelore (*Bos indicus*; 7.6±0.1 months; 206.4±4.2 kg) and 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*; 8.9±0.1 months; 228.9±8.6 kg), kept on 24 ha of rotational grazing with *Urochloa brizantha* cv. Piatã, with *ad libitum* access to mineral mix and water. Ultrasound and semen evaluations were performed for 12 consecutive months, and the data were organized into three time points: at the manifestation of the first (1st) ejaculation, at the beginning of puberty, and in the post-pubertal phase (Nelore: 14.0±0.6; 16.2±0.3; 19.5±0.2 months; Canchim: 13.1±0.5; 15.2±0.5; 20.0±0.1 months). Semen was collected monthly by electroejaculation, and the onset of puberty was determined when ≤50 million total spermatozoa and 10% subjective progressive motility were observed in the ejaculate. Ultrasonographic evaluations were performed in B-mode (7.5 MHz) and spectral Doppler, using a Z60 Vet® device with a linear transducer (5.0–8.0 MHz). Images of the testicular parenchyma were obtained in longitudinal sections, with three frames from each animal selected at each timepoint for analysis using Image Pro Plus 7.0™ software to determine echogenicity (average pixel count) and heterogeneity (standard deviation) using a grayscale from 0 (absolute black) to 255 (absolute white). The hemodynamics of the suprastesticular artery were evaluated using pulsatility (PI) and resistivity (RI) indices. For the analysis, the averages of the left and right testicles were considered. Statistical analyses were performed separately by breed across the three reproductive phases (*timepoints*), using mixed-model ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$) in R (R Core Team, 2023). For the Nelore breed, there was no difference in echogenicity and heterogeneity of the testicular parenchyma ($P=0.70$ and $P=0.40$) between the 1st ejaculate (68.4±3.2 and 13.0±0.4), the onset of puberty (70.9±3.4 and 13.2±0.4) and post-puberty (66.9±3.2 and 12.5±0.4). For the Canchim breed, there was a difference in testicular parenchyma echogenicity ($P=0.04$), with values in the 1st ejaculate (80.0±4.2ab) similar to the beginning of puberty (83.0±4.4a), but higher than post-puberty (71.5±4.2b). For parenchymal heterogeneity ($P=0.01$), the values in the 1st ejaculate (13.8±0.4a) were similar to those at the beginning of puberty (13.5±0.4ab), but higher than those at post-puberty (12.6±0.4b). For PI in Nelore bulls, there was a difference ($P=0.01$), with the highest value in the 1st ejaculate (0.8±0.04a), not differing from the onset of puberty (0.7±0.04ab), and the lowest value in post-puberty (0.6±0.04b). The same pattern was observed for RI ($P=0.005$), with values of 0.6±0.02a, 0.5±0.02ab and 0.5±0.02b for the 1st ejaculate, onset of puberty and post-puberty, respectively. For the Canchim breed, there was no difference for PI and RI, with PI values (0.7±0.05; 0.7±0.05; 0.7±0.05; $P=0.98$) and RI (0.5±0.02; 0.5±0.02; 0.5±0.02; $P=0.90$) for the 1st ejaculate, onset of puberty and post-puberty, respectively. Higher echogenic values in the early stages may be associated with lower structural maturity of the seminiferous tubules, due to less fluid in the interstitium, altering echogenicity and heterogeneity. Conversely, reduced PI and RI in the post-pubertal phase indicate lower vascular resistance and higher perfusion, potentially favoring spermatogenesis. In general, testicular echogenic and hemodynamic parameters varied according to the reproductive phase, but differently in each breed. These findings indicate that these changes throughout reproductive development depend on the bull's genotype.

Keywords: animal andrology, ultrasound, testicular hemodynamics, cattle.

Legal authorizations: All experimental procedures were approved by the CEUA of Embrapa Pecuária Sudeste (protocol no. PRT02/2023).

Acknowledgments and funders: To FAPESP (Process 2021/04335-3) and CNPq (Processes 312295/2022-7; 402044/2025-8; 150335/2025-3; 150199/2026-0).

Caracterização andrológica e funcional de dois casos de criptorquidismo unilateral inguinal em touros Nelore

Ana Laura Pasqualinotto¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Maria Fernanda Lema Carneiro¹, Julia Roismann¹, Laura Nataly Garcia Oliveros¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: analaurapasq@usp.br

O criptorquidismo é uma alteração do desenvolvimento reprodutivo caracterizada pela falha na migração de um ou ambos os testículos ao escroto durante a vida fetal, o que compromete a termorregulação e o potencial reprodutivo dos machos. O objetivo deste trabalho foi relatar e caracterizar dois casos de criptorquidismo unilateral em touros da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade de 15 e 18 meses no momento da avaliação. O diagnóstico foi estabelecido por meio de exame clínico, incluindo palpação escrotal e da região inguinal, análise da integridade e da vascularização do parênquima testicular por ultrassonografia (modos B e Doppler colorido) e da temperatura da superfície escrotal por termografia. Em ambos os casos, observou-se a presença apenas do testículo esquerdo no escroto, com retenção do testículo contralateral na região inguinal, caracterizando criptorquidismo. No animal 1, com 18 meses de idade, o testículo esquerdo apresentou perímetro escrotal (PE) de 25,2 cm, consistência testicular 4 (1 a 5) e cauda do epidídimo medindo 22 × 18 mm. Ao exame ultrassonográfico, o parênquima testicular era homogêneo, sem alterações de vascularização e de temperatura da superfície escrotal. O testículo contralateral direito, retido na região inguinal, apresentou dimensões reduzidas, sem alterações ultrassonográficas do parênquima nem da vascularização. Na avaliação espermática, observou-se volume de 8,5 mL, concentração de 125 × 10⁶ espermatozoides/mL, motilidade de 55% (0% a 100%) e vigor de 3 (1 a 5). A avaliação morfológica revelou 35% de defeitos totais (29,5% maiores e 5,5% menores), com predominância de *pouch formation* (10%), cabeças piriformes (6,5%), defeitos de inserção da peça intermediária (4%), defeitos de acrossoma (3,5%), gota citoplasmática proximal (3,5%) e cabeça estreita na base (3,5%). No animal 2, com 15 meses de idade, o testículo esquerdo apresentou PE de 26,5 cm, consistência testicular 3 e cauda do epidídimo medindo 20 × 29 mm, com parênquima testicular dentro dos padrões de normalidade. O testículo contralateral direito, localizado parcialmente na região inguinal, apresentava dimensões reduzidas e heterogeneidade do parênquima testicular, sugestivas de degeneração testicular. Durante a colheita de sêmen, observou-se aderência da bainha prepucial à glândula peniana, indicando imaturidade sexual. Na avaliação espermática, obteve-se um volume de 9,5 mL, concentração de 125 × 10⁶ espermatozoides/mL, motilidade de 20% e vigor de 2. A análise morfológica evidenciou 64,5% de defeitos totais, sendo 55,5% maiores e 9% menores, com destaque para cauda dobrada com gota distal (15%), *pouch formation* (8%), defeitos de acrossoma (7,5%), cabeças piriformes (5,5%) e caudas fortemente dobradas (5,0%). Conclui-se que a associação entre exame clínico e ferramentas de imagem (ultrassonografia e termografia) é eficaz na identificação de anomalias testiculares e de seu impacto na qualidade seminal, evidenciando maior comprometimento no animal com alteração do parênquima testicular, possivelmente relacionada à degeneração testicular e, conseqüentemente, ao prejuízo na espermatogênese e na maturação espermática. Esses achados reforçam a importância do exame andrológico cuidadoso em machos jovens, contribuindo para a identificação precoce de alterações reprodutivas e para a adequada seleção de potenciais reprodutores.

Palavras-chave: bovinos, criptorquidia, espermograma, ultrassonografia testicular, doppler colorido.

Autorizações legais: CEUA/FZEA-USP: protocolo n.º 9249180123 e CEUA/FMVZ-USP n. 265190525.

Agradecimentos e financiadores: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2023/01059-0) pelo apoio financeiro.

Andrological and functional characterization of two cases of unilateral inguinal cryptorchidism in Nelore bulls

Ana Laura Pasqualinotto¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Maria Fernanda Lema Carneiro¹, Julia Roismann¹, Laura Nataly Garcia Oliveros¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: analaurapasq@usp.br

Cryptorchidism is a reproductive developmental disorder characterized by the failure of one or both testes to descend into the scrotum, compromising thermoregulation and the reproductive potential of males. The objective of this study was to report and characterize two cases of unilateral cryptorchidism in Nelore bulls (*Bos indicus*), aged between 15 and 18 months at the time of evaluation. Diagnosis was established through clinical examination, including scrotal and inguinal palpation, assessment of testicular parenchyma integrity and vascularization via ultrasonography (B-mode and Color Doppler), and analysis of scrotal surface temperature by thermography. In both cases, only the left testis was present in the scrotum, with retention of the contralateral testis in the inguinal region. In animal 1, aged 18 months, the left testis presented a scrotal circumference (SC) of 25.2 cm, testicular consistency of 4 (1-5), and an epididymal tail measuring 22 × 18 mm, with homogeneous testicular parenchyma and no alterations in vascularization or scrotal surface temperature. The contralateral right testis showed reduced dimensions but no ultrasonographic changes in parenchyma or vascularization. Semen evaluation showed a volume of 8.5 mL, a concentration of 125 × 10⁶ spermatozoa/mL, 55% (0% - 100%) motility, and a vigor of 3 (1-5). Morphological analysis revealed 35% total defects (29.5% major and 5.5% minor), predominantly pouch formation (10%), pyriform heads (6.5%), defects of insertion of the midpiece (4%), acrosome defects (3%), proximal cytoplasmic droplets (3.5%), and narrow-based heads (3.5%). In animal 2, aged 15 months, the left testis presented an SC of 26.5 cm, testicular consistency of 3, and an epididymal tail measuring 20 × 29 mm, with the testicular parenchyma within normal standards. The contralateral right testis, partially located in the inguinal region, showed reduced dimensions and parenchymal heterogeneity suggestive of testicular degeneration. During semen collection, a prepuccial adhesion on the glans penis was observed, indicating sexual immaturity. Semen evaluation yielded a volume of 9.5 mL, a concentration of 125 × 10⁶ spermatozoa/mL, 20% motility, and a vigor of 2. Morphological analysis evidenced 64.5% total defects (55.5% major and 9% minor), highlighting bent tails with distal droplets (15%), pouch formation (8%), acrosome defects (7.5%), pyriform heads (5.5%), and strongly folded tails (5%). The integration of clinical examination and imaging tools (ultrasonography and thermography) is effective in identifying testicular alterations and their impact on seminal quality. The results demonstrate greater impairment in the animal with alterations in the testicular parenchyma, suggesting testicular degeneration with consequent impairment of spermatogenesis and sperm maturation. These findings reinforce the importance of a complete breeding soundness evaluation in young males, contributing to the early identification of reproductive disorders and the proper selection of potential sires.

Keywords: cattle, cryptorchidism, spermogram, testicular ultrasound, color doppler.

Legal authorizations: CEUA/FZEA-USP: protocol no. 9249180123 and CEUA/FMVZ-USP n. 5265190525.

Acknowledgments and funders: The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP, n° 2023/01059-0) for financial support

Caracterização do proteoma espermático associado à fertilidade em touros da raça Nelore

Laura Nataly Garcia Oliveros^{1,2}, Alexandre da Rocha Bozzi^{1,2}, Fernanda Baatsch Nascimento², Thais de Oliveira Cardoso Silva², Ana Laura Pasqualinotto², Juliana Portela Gonçalves Fagundes², Dallet Amorim Paes Almeida², Daniel Silva Antonelo³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini²

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,

³Lipid Marker Omics Sciences Ltda.

E-mail: natalygarcia624@gmail.com

A fertilidade espermática em touros é regulada por múltiplos fatores funcionais e moleculares, sendo os espermatozoides maduros controlados principalmente por mecanismos pós-transcricionais. Embora altamente especializadas, a competência dessas células depende de um conteúdo proteico íntegro, que reflete diretamente os processos de metabolismo energético, e da capacidade de interação entre espermatozoides e oócitos, o que pode explicar variações de fertilidade observadas em programas de IATF que não são detectadas por análises seminais convencionais. Abordagens proteômicas têm se mostrado fundamentais para a identificação de biomarcadores, uma vez que proteínas diferenciais podem explicar as variações de fertilidade observadas em campo. Nesse sentido, os objetivos deste estudo foi identificar e comparar o perfil proteômico diferencial de espermatozoides de touros Nelore classificados em distintos fenótipos de fertilidade. Tomando por base resultados de taxa de prenhez após IATF, obtido de um banco de dados (Concept Plus® - Alta Genetics, com ~52.000 inseminações), 8 touros foram classificados em: Alta Fertilidade (AF, n=4; prenhez 54,3±1,0%) e Baixa Fertilidade (BF, n=4; prenhez 41,5±2,3%). Realizou-se um pool de três ejaculados de cada touro, dentro de cada grupo. Proteínas de 150 × 10⁶ espermatozoides foram extraídas em tampão UTCD (Ureia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 1%) e analisadas por UPLC-MS/MS (untargeted). Para a estatística, utilizou-se ANOVA com correção de Benjamini-Hochberg (FDR), além de uma abordagem exploratória ($P \leq 0,05$ não ajustado) para identificação de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs). Aplicou-se o critério de consistência técnica para o mapeamento dos perfis: proteínas exclusivas, detectadas em $n \geq 3$ das 4 amostras de cada grupo, e proteínas comuns (Core Proteome), detectadas em $n \geq 6$ das 8 amostras totais do experimento. Foram identificadas 574 proteínas totais e após o refinamento por comparação direta (Diagrama de Venn), identificou-se uma assinatura molecular específica, composta por 19 proteínas exclusivas ao grupo AF e por 38 ao grupo BF. A análise de abundância diferencial ($P \leq 0,05$) demonstrou que touros AF apresentaram maior abundância de proteínas ACE (logFC = 1,99) e SLC2A3 (logFC = 0,88). A proteína ACE apresentou intensidade significativamente superior no grupo AF, apesar de sua detecção técnica no grupo oposto, sugerindo uma regulação quantitativa associada à alta fertilidade. A SLC2A3 apresentou frequência superior e maior abundância no grupo AF, indicando variações no aporte proteico metabólico entre os fenótipos. No grupo BF, observou-se maior abundância estatisticamente significativa de CCIN, MYG1, SPA17 e TMEM210, proteínas que compõem uma assinatura molecular distinta associada ao menor desempenho reprodutivo. Touros Nelore de alta e baixa fertilidade apresentam perfis proteômicos contrastantes, caracterizados por um conjunto de proteínas compartilhadas e por assinaturas proteômicas específicas. A maior abundância de ACE e SLC2A3 em touros de alta fertilidade, somada à detecção de 190 proteínas exclusivas para este fenótipo, aponta para potenciais biomarcadores promissores da competência espermática zebuína, fornecendo subsídios para a compreensão da fisiologia reprodutiva em condições de campo.

Palavras-chave: proteômica, espermatozoide, marcadores moleculares, potencial de fertilidade, *Bos indicus*.

Autorizações legais: CEUA/FMVZ-USP: protocolo nº 6262170522.

Agradecimentos e financiadores: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de doutorado e pós-doutorado (processos nº 2020/14918-3 e 2025/12589-6) e auxílio à pesquisa (processo nº 2023/01059-0).

Sperm proteome characterization associated with fertility in Nelore bulls

Laura Nataly Garcia Oliveros^{1,2}, Alexandre da Rocha Bozzi^{1,2}, Fernanda Baatsch Nascimento², Thais de Oliveira Cardoso Silva², Ana Laura Pasqualinotto², Juliana Portela Gonçalves Fagundes², Dallet Amorim Paes Almeida², Daniel Silva Antonelo³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini²

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,

³Lipid Marker Omics Sciences Ltda.

E-mail: natalygarcia624@gmail.com

Sperm fertility in bulls is regulated by multiple functional and molecular factors, with mature spermatozoa being primarily controlled by post-translational mechanisms. Although highly specialized, the competence of these cells depends on an intact protein content that directly reflects energy metabolism processes and the capacity for interaction between spermatozoa and oocytes, which may explain fertility variations observed in FTAI programs not detected by conventional semen analysis. Proteomic approaches have proven fundamental for identifying biomarkers, as differential proteins can explain fertility variations observed in the field. In this study, we aimed to identify and compare the differential proteomic profile of spermatozoa from Nelore bulls classified into distinct fertility phenotypes. Based on pregnancy rates after FTAI obtained from a database (Concept Plus® - Alta Genetics, with ~52,000 inseminations), 8 bulls were classified as: High Fertility (HF, n=4; pregnancy rate 54.3±1.0%) and Low Fertility (LF, n=4; pregnancy rate 41.5±2.3%). A pool of three ejaculates from each bull was performed within each group. Proteins from 150 x 10⁶ spermatozoa were extracted in UTCD buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT) and analyzed by untargeted UPLC-MS/MS. Statistical analysis was performed using ANOVA with Benjamini-Hochberg (FDR) correction, in addition to an exploratory approach ($P \leq 0.05$, unadjusted) to identify differentially abundant proteins (DAPs). Technical consistency criteria were applied for profile mapping: exclusive proteins were those detected in $n \geq 3$ of the 4 samples per group, and common proteins (Core Proteome) were those detected in $n \geq 6$ of the 8 total experimental samples. A total of 574 proteins were identified, and after refinement using direct comparison (Venn Diagram), a specific molecular signature was identified, including 19 proteins exclusive to the HF group and 38 to the LF group. Differential abundance analysis ($P \leq 0.05$) showed that HF bulls had a higher abundance of ACE (logFC = 1.99) and SLC2A3 (logFC = 0.88) proteins. The ACE protein showed significantly higher intensity in the HF group despite its technical detection in the opposite group, suggesting quantitative regulation associated with high fertility. SLC2A3 showed a higher frequency and greater abundance in the HF group, indicating variation in the metabolic supply of proteins between phenotypes. In the LF group, a statistically significantly higher abundance of CCIN, MYG1, SPA17, and TMEM210 was observed proteins that compose a distinct molecular signature associated with lower reproductive performance. Nelore bulls of high and low fertility present contrasting proteomic profiles, characterized by a set of shared proteins and specific proteomic signatures. The higher abundance of ACE and SLC2A3 in high-fertility bulls, combined with the detection of proteins exclusive to this phenotype, suggests these proteins as promising biomarkers of Zebu sperm competence, providing insights into reproductive physiology under field conditions.

Keywords: proteomics, spermatozoa, molecular markers, fertility potential, *Bos indicus*.

Legal authorizations: CEUA/FMVZ-USP: protocol No 6262170522.

Acknowledgments and funders: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for granting the doctoral and post-doctoral fellowship (Grant No. 2020/14918-3 and 2025/12589-6) and the regular research grant (Grant No. 2023/01059-0).

Cinética do sêmen bovino descongelado analisado em dois sistemas comerciais de CASA

Isabeli Pastore¹, Camila Keterine Gorzelanski Trenkel¹, André Marcos Dezan Bieniek¹, Edi Kava Kailer¹, Luis Fernando Fernandes de Azevedo¹, Jonatas Cattelan¹, Matheus Ramos Rosin¹, Antonio Campanha Martinez², Adalgiza Pinto Neto¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, ²Universidade Estadual de Maringá
E-mail: pastoreisabeli@gmail.com

O uso de sêmen criopreservado na reprodução bovina é a biotecnologia de maior crescimento. Assim é essencial a realização de avaliação criteriosa pós-descongelamento do sêmen, por métodos objetivos e precisos, como feito pelo sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*). No entanto, os sistemas CASA comerciais e disponíveis utilizam tecnologias diferentes que dificultam a padronização e/ou comparação dos resultados. Assim, objetiva-se com este estudo, avaliar simultaneamente o sêmen bovino congelado/descongelado em dois sistemas computadorizados comerciais, a fim de comparar as características seminais mensuradas em cada sistema utilizado. Para tanto, 20 palhetas comerciais de sêmen de diferentes animais (0,25mL), raças e procedência foram descongeladas em banho-maria (37°C/30s), homogêneas em tubos *eppendorf* e avaliadas simultaneamente por dois sistemas computadorizados comerciais, sendo: sistema A (IVOS-II®, Hamilton Thorne) e sistema B (AndroVision®, Minitube), avaliando cinco campos por amostra em câmara de contagem (LejaR, IMV), considerando os parâmetros de cinética espermática: motilidade (motilidade total – MT; progressiva – MP; rápida – MR; lenta – ML e espermatozoides estáticos), velocidade (velocidade média do percurso – VAP – $\mu\text{m/s}$; velocidade curvilínea – VCL – $\mu\text{m/s}$ e velocidade em linha reta – VSL – $\mu\text{m/s}$) e trajetória (distância média percorrida – DAP – μm ; distância curvilínea – DCL – μm ; distância em linha reta – DSL – μm ; amplitude lateral da cabeça – ALH – $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar – BCF – Hz; linearidade – LIN – μm e retidão – STR – $\mu\text{m/s}$). Os dados foram submetidos a ANOVA pelo PROC GLM do SAS, considerando 5,0% de significância ($p < 0,05$). Os resultados indicaram que o número médio de espermatozoides analisados e a concentração média do sêmen foi semelhante nas avaliações realizadas pelos sistemas CASA A e B ($p > 0,05$). Ao considerar os parâmetros de motilidade, observou-se que a porcentagem de espermatozoides com motilidade total (MT) foi semelhante entre os sistemas CASA ($p > 0,05$), enquanto a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (MP) e com motilidade lenta (ML) foi maior na avaliação realizada no CASA B ($p < 0,05$), e a porcentagem de espermatozoides com motilidade rápida (MR) foi maior no sistema CASA A ($p < 0,05$). Na velocidade espermática, observou-se que a velocidade média do percurso (VAP) dos espermatozoides foi maior quando avaliada pelo CASA A ($p < 0,05$), enquanto a velocidade média curvilínea (VCL) e a velocidade média em linha reta (VSL) percorrida pelos espermatozoides foi semelhante entre os sistemas CASA ($p > 0,05$). Para a trajetória espermática foi observado que a distância média percorrida (DAP) pelos espermatozoides, a distância média curvilínea (DCL), a distância média em linha reta (DSL) e a frequência média de batimento flagelar (BCF) foi maior quando a avaliação do sêmen foi realizada no CASA A ($p < 0,05$). A linearidade (LIN) e a retidão (STR) apresentada pelos espermatozoides foi semelhante nas avaliações realizadas pelos CASA A e B ($p > 0,05$). Apesar do sistema CASA fornecer informações importantes sobre a cinética espermática, ainda não há consenso entre os pesquisadores sobre quais seriam os indicadores reais da fertilidade *in vivo* do sêmen analisado. Embora as análises realizadas nos dois sistemas CASA permitam a mensuração objetiva de diferentes características da célula espermática, com alto nível de precisão e segurança, e eliminam a subjetividade das análises convencionais, ainda há lacunas a serem elucidadas. Indicadores relativos à cinética, movimento e trajetória espermática analisados em uma mesma amostra pelos dois sistemas utilizados, apresentaram diferença, o que dificulta e/ou inviabiliza a comparação dos resultados de análise espermática, quando realizada em sistemas diferentes. No entanto, diferenças na funcionalidade dos softwares dos sistemas comerciais, especialmente na mensuração das populações espermáticas, podem explicar os resultados.

Palavras-chave: análise computadorizada de sêmen, avaliação espermática, viabilidade espermática.

Kinetics of thawed bovine semen analyzed using two commercial CASA systems

Isabeli Pastore¹, Camila Keterine Gorzelanski Trenkel¹, André Marcos Dezan Bieniek¹, Edi Kava Kailer¹, Luis Fernando Fernandes de Azevedo¹, Jonatas Cattelam¹, Matheus Ramos Rosin¹, Antonio Campanha Martinez², Adalgiza Pinto Neto¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, ²Universidade Estadual de Maringá
E-mail: pastoreisabeli@gmail.com

The use of cryopreserved semen in bovine reproduction is the fastest-growing biotechnology. A thorough post-thaw evaluation of semen using objective and precise methods, such as those provided by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system, is essential. However, commercially available CASA systems employ different technologies, which make standardization and/or comparison of results difficult. Thus, this study aimed to simultaneously evaluate frozen/thawed bovine semen using two commercial computerized systems to compare the seminal characteristics measured by each system. To this end, 20 commercial semen straws (0.25 mL) from different animals, breeds, and origins were thawed in a water bath (37°C for 30 s), homogenized in Eppendorf tubes, and simultaneously evaluated using two commercial CASA systems: system A (IVOS-II®, Hamilton Thorne) and system B (AndroVision®, Minitube). Five fields per sample were analyzed in a counting chamber (LejaR, IMV), considering sperm kinetic parameters related to motility (total motility – TM; progressive motility – PM; rapid motility – RM; slow motility – SM; and static spermatozoa), velocity (average path velocity – VAP, $\mu\text{m/s}$; curvilinear velocity – VCL, $\mu\text{m/s}$; and straight-line velocity – VSL, $\mu\text{m/s}$), and trajectory (average path distance – DAP, μm ; curvilinear distance – DCL, μm ; straight-line distance – DSL, μm ; amplitude of lateral head displacement – ALH, $\mu\text{m/s}$; beat cross frequency – BCF, Hz; linearity – LIN, μm ; and straightness – STR, $\mu\text{m/s}$). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the PROC GLM procedure of SAS, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). The results indicated that the mean number of spermatozoa analyzed and the mean semen concentration were similar between CASA systems A and B ($p > 0.05$). Regarding motility parameters, total motility (TM) did not differ between systems ($p > 0.05$), whereas progressive motility (PM) and slow motility (SM) were higher in CASA B ($p < 0.05$), and rapid motility (RM) was higher in CASA A system ($p < 0.05$). In terms of sperm velocity, average path velocity (VAP) was higher when evaluated using CASA A ($p < 0.05$), while curvilinear velocity (VCL) and straight-line velocity (VSL) were similar between CASA systems ($p > 0.05$). For trajectory parameters, average path distance (DAP), curvilinear distance (DCL), straight-line distance (DSL), and beat cross frequency (BCF) were higher in CASA A ($p < 0.05$). Linearity (LIN) and straightness (STR) were similar between both systems ($p > 0.05$). Although the CASA system provides important information on sperm kinetics, there is still no consensus among researchers regarding which parameters are reliable indicators of *in vivo* fertility. While the analyses performed by both CASA systems used in this study allow the objective measurement of different sperm cell characteristics with high precision and reliability and eliminate the subjectivity inherent to conventional methods, important gaps remain. The indicators related to sperm kinetics, movement, and trajectory, analyzed in the same sample by the two systems used, showed differences, making it difficult or even not feasible to reliably compare sperm analysis results obtained from different systems. However, differences in software functionality among commercially available systems, such as the measurement of sperm populations, may explain the differences observed in this study.

Keywords: computerized semen analysis, sperm evaluation, sperm viability.

Legal authorizations: no applicable

Comparação da taxa de retenção de sêmen entre três modelos de bainhas utilizadas na inseminação artificial bovina

Ana Laura Pasqualinotto¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹, Mariana Karla Francolino da Silva^{1,2}, André Maciel Crespillo^{3,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²VetSêmen, ³Central Bela Vista
E-mail: analaurapasq@usp.br

A inseminação artificial (IA) é uma biotecnologia amplamente utilizada na bovinocultura, contribuindo para o melhoramento genético e o aumento da produtividade. O sucesso dessa técnica depende de fatores como a qualidade do sêmen e a correta execução do procedimento. Além disso, os consumíveis utilizados na IA também podem influenciar as taxas de concepção das fêmeas inseminadas. Nesse contexto, as bainhas de inseminação desempenham papel fundamental, pois acoplam as palhetas ao aplicador, permitindo a deposição do sêmen no trato reprodutor feminino. Estudos anteriores demonstraram que uma pequena fração da dose inseminante pode permanecer retida no interior das bainhas, comprometendo a eficiência da técnica. Dessa forma, a avaliação da retenção de sêmen em diferentes modelos de bainhas torna-se relevante para compreender o desempenho desses dispositivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de retenção de sêmen (TRS) em três modelos de bainhas de inseminação artificial utilizadas em bovinos, denominadas bainhas A, B e C. Essas foram caracterizadas, respectivamente, como: modelo de menor diâmetro externo, destinado ao uso em novilhas (A); modelo com ponta de formato anatômico arredondado, visando à redução do atrito durante a passagem cervical e ao menor risco de lesões nas mucosas (B); e modelo convencional sem fenda, com sistema de acoplamento padrão às palhetas, favorecendo a vedação e a estabilidade do conjunto durante o procedimento (C). Inicialmente foram realizadas 784 observações experimentais e, após identificação e remoção de valores discrepantes utilizando o método do intervalo interquartil (IQR), 722 observações foram consideradas para análise. Para a determinação da retenção de sêmen, utilizou-se uma balança analítica (0,0001 g), com todas as mensurações realizadas pelo mesmo técnico. Palhetas de 0,25 mL foram previamente cortadas para padronização do procedimento e pesadas individualmente, assim como as bainhas. Em seguida, cada bainha foi acoplada à respectiva palheta e o conjunto foi pesado. Posteriormente, realizou-se a simulação da inseminação artificial utilizando aplicadores compatíveis com cada modelo de bainha, mimetizando o procedimento a campo. Após essa etapa, o conjunto bainha-palheta foi novamente pesado, permitindo estimar a quantidade de sêmen retido no sistema. A TRS foi determinada com base na diferença de massa antes e após o procedimento. A massa inicial de sêmen foi obtida pela diferença entre o peso da palheta cheia e o da palheta vazia, enquanto a massa retida na bainha foi calculada a partir da diferença entre o peso do conjunto bainha-palheta após o procedimento e a soma dos pesos da bainha e das palhetas vazias. A TRS foi expressa em porcentagem, sendo calculada como a razão entre a massa de sêmen retida e a inicial. Assim, foram analisadas 239 observações para a bainha A, 233 para a bainha B e 250 para a bainha C. As médias de TRS foram de $6,08 \pm 3,95\%$ para a bainha A, $6,43 \pm 4,84\%$ para a bainha B e $4,85 \pm 3,93\%$ para a bainha C. A análise por modelo linear generalizado demonstrou efeito do tipo de bainha sobre a TRS ($F = 9,31$; $P < 0,001$). Não foi observada diferença entre as bainhas A e B ($P = 0,64$), enquanto a bainha C apresentou menor retenção em relação às bainhas A ($P = 0,004$) e B ($P = 0,0001$). Os resultados indicam que o modelo de bainha pode influenciar no volume de sêmen efetivamente depositado no trato reprodutor de vacas submetidas à IA. A menor retenção observada na bainha C pode estar relacionada a características de seu design, como a ausência de sistemas de vedação e a geometria interna mais simples, favorecendo menor retenção de sêmen no interior da bainha e, conseqüentemente, maior eficiência na liberação da dose inseminante. Dessa forma, esses achados reforçam a importância das características estruturais das bainhas na eficiência do procedimento, contribuindo para o aprimoramento desses dispositivos.

Palavras-chave: retenção de sêmen, bainhas de inseminação, eficiência reprodutiva, reprodução bovina.

Autorizações legais: O presente estudo não envolveu procedimentos experimentais invasivos ou que implicassem em manipulação que demandasse aprovação por Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Agradecimentos e financiadores: Central Bela Vista, Botucatu - SP.

Comparison of semen retention rate among three models of sheaths used in bovine artificial insemination

Ana Laura Pasqualinotto¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹, Mariana Karla Francolino da Silva^{1,2}, André Maciel Crespilho^{3,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²VetSêmen, ³Central Bela Vista
E-mail: analaurapasq@usp.br

Artificial insemination (AI) is a biotechnology widely used in cattle production, contributing to genetic improvement and increased productivity. The success of this technique depends on factors such as semen quality and the correct execution of the procedure. In addition, the consumables used in AI may also influence the conception rates of inseminated females. In this context, insemination sheaths play a fundamental role, as they couple the straws to the applicator, allowing semen deposition in the female reproductive tract. Previous studies have shown that a small fraction of the insemination dose may remain retained inside the sheaths, compromising the efficiency of the technique. Thus, evaluating semen retention in different sheath models becomes relevant to understand the performance of these devices. The objective of this study was to evaluate the semen retention rate (SRR) in three models of artificial insemination sheaths used in cattle, designated as sheaths A, B, and C. These were characterized, respectively, as: a model with smaller external diameter, intended for use in heifers (A); a model with a rounded anatomical tip, aiming to reduce friction during cervical passage and minimize the risk of mucosal lesions (B); and a conventional model without a slit, with a standard coupling system to the straws, favoring sealing and stability of the assembly during the procedure (C). Initially, 784 experimental observations were performed and, after identification and removal of outliers using the interquartile range (IQR) method, 722 observations were considered for analysis. For the determination of semen retention, an analytical balance (0.0001 g) was used, with all measurements performed by the same technician. Straws of 0.25 mL were previously cut to standardize the procedure and individually weighed, as well as the sheaths. Then, each sheath was coupled to its respective straw and the assembly was weighed. Subsequently, artificial insemination was simulated using applicators compatible with each sheath model, mimicking field conditions. After this step, the sheath–straw assembly was weighed again, allowing the estimation of the amount of semen retained in the system. The SRR was determined based on the difference in mass before and after the procedure. The initial semen mass was obtained from the difference between the weight of the filled straw and the empty straw, while the mass retained in the sheath was calculated from the difference between the weight of the sheath–straw assembly after the procedure and the sum of the weights of the sheath and the empty straws. The SRR was expressed as a percentage and calculated as the ratio between retained semen mass and initial semen mass. Thus, 239 observations were analyzed for sheath A, 233 for sheath B, and 250 for sheath C. The mean SRR values were $6.08 \pm 3.95\%$ for sheath A, $6.43 \pm 4.84\%$ for sheath B, and $4.85 \pm 3.93\%$ for sheath C. Generalized linear model analysis showed an effect of sheath type on SRR ($F = 9.31$; $P < 0.001$). No difference was observed between sheaths A and B ($P = 0.64$), whereas sheath C showed lower retention compared to sheaths A ($P = 0.004$) and B ($P = 0.0001$). The results indicate that the sheath model may influence the volume of semen effectively deposited in the reproductive tract of cows subjected to AI. The lower retention observed in sheath C may be related to characteristics of its design, such as the absence of sealing systems and a simpler internal geometry, favoring lower semen retention within the sheath and, consequently, greater efficiency in releasing the insemination dose. Thus, these findings reinforce the importance of the structural characteristics of sheaths in the efficiency of the procedure, contributing to the improvement of these devices.

Keywords: semen retention, insemination sheaths, reproductive efficiency, bovine reproduction.

Legal authorizations: This study did not involve invasive experimental procedures or manipulation requiring approval by an Animal Ethics Committee (CEUA).

Acknowledgments and funders: Central Bela Vista, Botucatu - SP.

Correlação entre a presença de miR-93 e a integridade da membrana plasmática em espermatozoides bovinos

Fernanda Brambilla Martins¹, Raíssa Victória Ferraz Benzati¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção², Thais Rose dos Santos Hamilton¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: fernanda.brambilla@unesp.br

O espermatozoide não é mais considerado uma célula limitada essencialmente à entrega do genoma paterno ao oócito. Avanços na biologia molecular reprodutiva têm demonstrado que essa célula carrega um conjunto complexo de componentes regulatórios capazes de influenciar etapas cruciais da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Além do material genético, o espermatozoide transporta moléculas que desempenham papel relevante na regulação pós-fecundação, entre eles os microRNAs (miRNAs). Estudo recente identificou o miR-93 exclusivamente em espermatozoides de touros com alta fertilidade na produção *in vitro* de embriões (PIVE), ou seja, alta taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* (total de blastocistos/total de estruturas clivadas). Apesar desses avanços, ainda existem lacunas importantes no que se refere à associação entre atributos espermáticos clássicos, como motilidade progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática, e esses marcadores moleculares. O presente estudo objetivou verificar a presença do miR-93 em amostras de sêmen bovino criopreservado, bem como investigar sua correlação com motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática. Foram analisadas 20 amostras de sêmen criopreservado de touros da raça Nelore provenientes de Central de Coleta e Processamento de Sêmen (Genex, Uberaba, Brasil). Duas palhetas por touro foram descongeladas à 37°C por 30 segundos e submetidas à avaliação de motilidade progressiva (%), vigor (escala de 0 a 5) e integridade de membrana plasmática (coloração eosina-nigrosina; BotuVital, Botupharma) por visualização em microscópio óptico (magnificação 100 e 400 vezes; Primo Star, Zeiss). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em Percoll 30% para remoção do diluidor, e os miRNAs totais foram extraídos a partir de 10 milhões de espermatozoides com o uso de kit comercial (miRNeasy Mini Kit, Qiagen). A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit miRCURY LNA RT (Qiagen), seguida da quantificação da expressão relativa do miR-93 por qPCR (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific). Análise estatística de correlação (Spearman) foi conduzida no software JASP (v.0.19.1). Como esperado, foi observada uma correlação positiva entre motilidade progressiva e vigor ($\rho = 0,860$; p).

Palavras-chave: microRNA, sêmen, fertilidade, epigenética, funcionalidade espermática.

Autorizações legais: CEUA/FCAV UNESP: 1113/2024

Agradecimentos e financiadores: CNPq Universal # 404669/2023-9; Genex; PIBIC UNESP RT

Sperm-delivered miR-93 correlates with membrane integrity in bovine sperm

Fernanda Brambilla Martins¹, Raíssa Victória Ferraz Benzati¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção², Thais Rose dos Santos Hamilton¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: fernanda.brambilla@unesp.br

Sperm are no longer considered cells limited primarily to deliver the paternal genome to oocyte. Advances in reproductive molecular biology have demonstrated that these cells carry a complex set of regulatory components capable of influence critical stages of fertilization and early embryo development. In addition to genetic material, sperm transport molecules that play important roles in post-fertilization regulation, including microRNAs (miRNAs). A recent study identified the miR-93 exclusively in sperm from bulls with high fertility in *in vitro* embryo production (IVP), characterized by high embryo development rates (total blastocysts/total cleaved structures). Despite these advances, important gaps remain regarding the association between classical sperm parameters, such as progressive motility, vigor, and plasma membrane integrity, and these molecular markers. The present study aimed to evaluate the presence of miR-93 in cryopreserved bovine semen samples and to investigate its correlation with progressive motility, vigor, and plasma membrane integrity. Twenty cryopreserved semen samples from Nellore bulls were obtained from a Semen Collection and Processing Center (Genex, Uberaba, Brazil). Two straws per bull were thawed at 37°C for 30 seconds, and evaluated for progressive motility (%), vigor (scale 0–5), and plasma membrane integrity using eosin–nigrosin staining (BotuVital, Botupharma) under light microscopy (Primo Star, Zeiss; 100× and 400× magnification). Samples were subsequently centrifuged in 30% Percoll to remove the extender, and total miRNAs were extracted from 10 million sperm by a commercial kit (miRNeasy Mini Kit, Qiagen). Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the miRCURY LNA RT kit (Qiagen), followed by relative quantification of miR-93 expression by qPCR (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific). Correlation analysis (Spearman) was conducted using JASP software (v.0.19.1). As expected, a positive correlation was observed between progressive motility and vigor ($\rho = 0.860$; $p < 0.001$), and a negative correlation between the percentages of sperm with damaged and intact plasma membranes ($\rho = -1.000$; $p < 0.001$). Additionally, miR-93 expression showed a positive correlation with the percentage of sperm with intact plasma membranes ($\rho = 0.489$; $p = 0.034$) and a negative correlation with the percentage of cells with membrane damage ($\rho = -0.489$; $p = 0.034$). These findings indicate that sperm populations with higher plasma membrane integrity are associated with higher miR-93 abundance. One of the known targets of sperm-borne miR-93 is the CDKN1A gene (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), which encodes the p21 protein, whose activation contributes to the suppression of embryo development under unfavorable uterine conditions. Therefore, its activity during early embryo stages may play a protective role in maintaining embryo genomic integrity.

Keywords: microRNA, semen, fertility, epigenetics, sperm function.

Legal authorizations: CEUA/FCAV UNESP: 1113/2024

Acknowledgments and funders: CNPq Universal # 404669/2023-9; Genex; PIBIC UNESP RT

Criopreservação do sêmen bubalino: uma abordagem holística dos entraves biológicos, técnicos e de manejo em diferentes sistemas de produção

Jaci de Almeida¹

¹Universidade Santa Úrsula
E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

A criopreservação do sêmen bubalino constitui ferramenta estratégica para a difusão genética e ampliação da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Entretanto, sua aplicação na espécie permanece limitada por entraves inerentes às particularidades fisiológicas dos reprodutores e às condições de manejo nos diferentes sistemas de produção. Objetivou-se analisar, sob uma abordagem holística e aplicada, os principais fatores que comprometem a eficiência da criopreservação seminal em búfalos (*Bubalus bubalis*), integrando evidências da literatura com resultados obtidos pelo autor em condições de campo e em centrais de coleta. A criopreservação promove alterações estruturais, funcionais e bioquímicas nos espermatozoides, destacando-se o comprometimento da integridade das membranas plasmática e acrossomal, disfunção mitocondrial, intensificação do estresse oxidativo com consequente peroxidação lipídica, além da indução de processos de criocapacitação prematura. Tais alterações reduzem a longevidade celular e o potencial fertilizante, sendo agravadas por características intrínsecas da espécie, como a composição lipídica da membrana espermática, que confere menor resistência aos processos criogênicos quando comparada à espécie bovina. Em centrais de coleta, destacam-se como fatores limitantes a sazonalidade reprodutiva, a elevada sensibilidade dos reprodutores à eletroejaculação, a necessidade de condicionamento comportamental para coleta por vagina artificial e a ocorrência de refratariedade à coleta ao longo do tempo. Evidências oriundas de estudos conduzidos pelo autor demonstram que, embora o condicionamento possa ser estabelecido em curto período, a manutenção da libido e da qualidade seminal sob regime contínuo de coleta constitui um dos principais gargalos operacionais. Adicionalmente, observa-se elevada variabilidade intra e interindividual dos parâmetros seminais, resultando, com frequência, em ejaculados aptos ao uso *in natura* ou refrigerado, porém inadequados após o descongelamento. Em sistemas de produção a campo, fatores como estresse, manejo inadequado, estrutura social dos rebanhos e elevada relação touro:vaca impactam negativamente a espermatogênese e a qualidade seminal. Resultados prévios do autor evidenciam ampla variabilidade dos parâmetros seminais em função de idade, estação do ano, sistema de criação e nível de condicionamento dos reprodutores. Além disso, a limitada disponibilidade de reprodutores de elevado mérito genético, a alta consanguinidade dos rebanhos e a baixa adoção sistemática de exames andrológicos agravam o cenário, restringindo o progresso genético da espécie. Aspectos regulatórios também representam entraves relevantes, uma vez que a legislação brasileira restringe a comercialização de sêmen produzido fora de centrais registradas, limitando sua difusão e aplicação em larga escala. Diante desse contexto, os desafios associados à criopreservação do sêmen bubalino são de natureza multifatorial e interdependente. Torna-se imperativo o desenvolvimento de protocolos criobiológicos específicos para a espécie, associados à intensificação da seleção andrológica, ao adequado condicionamento comportamental dos reprodutores e à adoção de abordagens individualizadas na avaliação seminal. Nesse sentido, a identificação e validação de biomarcadores funcionais de criotolerância espermática, associados a ferramentas avançadas de análise seminal, despontam como estratégias promissoras para a seleção preditiva de reprodutores com maior aptidão à criopreservação. A integração desses fatores constitui elemento-chave para aumentar a eficiência da criopreservação e viabilizar a expansão sustentável da IATF na bubalinocultura.

Palavras-chave: andrologia animal, *Bubalus bubalis*, criopreservação.

Autorizações legais: Não se aplica

Agradecimentos e financiadores: Não se aplica

Cryopreservation of buffalo semen: A holistic approach to biological, technical, and management constraints in different production systems

Jaci de Almeida¹

¹Universidade Santa Úrsula
E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

Cryopreservation of buffalo semen constitutes a strategic tool for genetic dissemination and expansion of fixed-time artificial insemination (FTAI). However, its application in this species remains limited due to constraints inherent to the physiological particularities of the males and to management conditions across different production systems. The objective of this study was to analyze, from a holistic and applied perspective, the main factors that compromise the efficiency of semen cryopreservation in buffaloes (*Bubalus bubalis*), integrating evidence from the literature with results obtained by the author under field conditions and in semen collection centers. Cryopreservation induces structural, functional, and biochemical alterations in spermatozoa, notably impairing the integrity of the plasma and acrosomal membranes, causing mitochondrial dysfunction, increasing oxidative stress with consequent lipid peroxidation, and inducing premature capacitation-like changes. These alterations reduce cell longevity and fertilizing potential and are exacerbated by intrinsic species-specific characteristics, such as the lipid composition of the sperm membrane, which confers lower resistance to cryogenic processes when compared to the bovine species. In semen collection centers, major limiting factors include reproductive seasonality, high sensitivity of males to electroejaculation, the need for behavioral conditioning for artificial vagina collection, and the occurrence of refractoriness to semen collection over time. Evidence from studies conducted by the author indicates that, although conditioning can be achieved within a short period, maintaining libido and semen quality under continuous collection regimes remains a significant operational bottleneck. Additionally, high intra- and inter-individual variability in seminal parameters is observed, often resulting in ejaculates suitable for *in natura* or cooled use but unsuitable after thawing. Under field production systems, factors such as stress, inadequate management, herd social structure, and high bull-to-cow ratios negatively affect spermatogenesis and semen quality. Previous results from the author demonstrate substantial variability in seminal parameters depending on age, season, production system, and level of conditioning of the breeders. Furthermore, the limited availability of high genetic merit sires, high levels of inbreeding within herds, and the low systematic adoption of andrological examinations further aggravate the scenario, restricting genetic progress in the species. Regulatory aspects also represent relevant constraints, as Brazilian legislation restricts the commercialization of semen produced outside registered collection centers, limiting its dissemination and large-scale application. In this context, the challenges associated with buffalo semen cryopreservation are multifactorial and interdependent. It is imperative to develop species-specific cryobiological protocols, combined with intensified andrological selection, proper behavioral conditioning of breeders, and the adoption of individualized approaches in semen evaluation. In this regard, the identification and validation of functional biomarkers of sperm cryotolerance, associated with advanced semen analysis tools, emerge as promising strategies for the predictive selection of breeders with greater aptitude for cryopreservation. The integration of these factors represents a key element to improve cryopreservation efficiency and to enable the sustainable expansion of FTAI in buffalo production systems.

Keywords: animal andrology, *Bubalus bubalis*, cryopreservation.

Legal authorizations: Not applicable

Acknowledgments and funders: Not applicable

Diferenças morfométricas entre espermatozoides obtidos da cabeça, corpo e cauda do epidídimo após estresse térmico escrotal em touros

Ana Laura Amaral Cherain¹, Maria Alice de Almeida², Felipe Perecin², Maíra Bianchi Rodrigues Alves¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: ana.amaral-cherain@unesp.br

Ao final da espermatogênese os espermatozoides estão morfológicamente formados, porém ainda não possuem habilidade móvel e fértil. A aquisição dessas habilidades ocorre durante a maturação espermática ao longo do trânsito pela cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Neste processo, os espermatozoides interagem com os diferentes microambientes epididimários, sendo submetidos a condições distintas de osmolaridade, pH e conteúdo bioquímico-molecular passando assim por modificações que envolvem a aquisição de moléculas, a translocação da gota citoplasmática, a modificação da membrana plasmática e a estabilização da cromatina. O estresse térmico escrotal promove alterações espermáticas por prejudicar a espermatogênese, porém há poucas informações sobre os efeitos deste na maturação espermática. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfometria de espermatozoides isolados da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de touros submetidos ao estresse térmico escrotal. Para isso, touros Nelore (*Bos indicus*) foram distribuídos em dois grupos: controle (n=4; CO) e submetido ao estresse térmico (n=4; HS). O estresse térmico escrotal foi induzido por meio de bolsas insuladoras mantidas no escroto durante 48 horas. Ao final do estresse, os animais foram abatidos e o trato reprodutivo foi isolado para obtenção dos espermatozoides da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Após a obtenção, estes foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS. Em seguida, uma alíquota de 4 µL da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e imagens dos espermatozoides foram obtidas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000x. Após, 20 espermatozoides de cada segmento de cada touro foram avaliados quanto à morfometria espermática pelo programa ImageJ® que incluiu medidas de área, comprimento longitudinal e transversal da cabeça espermática; comprimento do flagelo e da peça intermediária; e área da gota citoplasmática. A análise de variância (ANOVA) associada ao teste de médias de Tukey foi utilizada para a análise estatística no programa SAS® Studio, considerando os fatores segmento (cabeça, corpo e cauda) e tratamentos (CO x HS) bem como suas interações. O nível de significância foi de $P \leq 0,05$. Houve interação entre tratamento e segmento apenas para o comprimento do flagelo ($P=0,0024$), que foi menor para os espermatozoides do corpo do epidídimo dos touros HS ($58,09 \pm 0,48 \mu\text{m}$) em relação aos espermatozoides da cabeça ($62,34 \pm 0,61 \mu\text{m}$), corpo ($65,248 \pm 1,22 \mu\text{m}$) e cauda ($62,26 \pm 0,44 \mu\text{m}$) dos touros CO. O comprimento do flagelo dos espermatozoides da cabeça ($59,33 \pm 0,61 \mu\text{m}$) e cauda ($61,07 \pm 0,94 \mu\text{m}$) dos touros HS foram semelhantes tanto com os do corpo de HS quanto com a cabeça, corpo e cauda de CO. Houve efeito de tratamento para as medidas da cabeça espermática de área ($P=0,04$; CO: $37,15 \pm 0,25^a$ vs. HS: $35,65 \pm 0,34^b \mu\text{m}^2$) e comprimento longitudinal ($P=0,03$; CO: $9,38 \pm 0,03$ vs. HS: $9,28 \pm 0,03 \mu\text{m}$) sendo estes maiores nos animais CO independente do segmento. Houve efeito de segmento para as medidas da cabeça espermática de área ($P=0,0001$; cab: $35,99 \pm 0,28^b$ vs. cor: $35,34 \pm 0,39^b$ vs. cau: $38,73 \pm 0,35^a \mu\text{m}^2$), comprimento longitudinal ($P=0,001$; cab: $9,39 \pm 0,03^a$ vs. cor: $9,17 \pm 0,05^b$ vs. cau: $9,42 \pm 0,04^a \mu\text{m}$) e transversal ($P<0,0001$; cab: $4,71 \pm 0,03^b$ vs. cor: $4,62 \pm 0,04^b$ vs. cau: $4,96 \pm 0,03^a \mu\text{m}$), bem como para a área da gota citoplasmática ($P<0,0001$; cab: $4,48 \pm 0,07^a$ vs. cor: $3,32 \pm 0,14^c$ vs. cau: $3,87 \pm 0,13^b \mu\text{m}^2$). Conclui-se que espermatozoides isolados de diferentes segmentos epididimário apresentam morfometria espermática distinta de cabeça e gota citoplasmática, e que o estresse térmico escrotal promove alterações na morfometria da área e comprimento longitudinal da cabeça espermática. Este estudo abre caminhos para a compreensão dos efeitos do estresse térmico sobre a maturação espermática.

Palavras-chave: epididimário, gameta masculino, motilidade, morfologia e fertilidade.

Autorizações legais: CEUA: FZEA-USP n° 8312020920.

Agradecimentos e financiadores: FAPESP 24/13164-6, 21/08759-2 e 19/23685-5. Edital PROPe 8/2024- 16566 - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp - Reserva Recém-Contratados.

Morphometric differences in sperm collected from the caput, corpus, and cauda segments of the epididymis following scrotal heat stress in bulls

Ana Laura Amaral Cherain¹, Maria Alice de Almeida², Felipe Perecin², Maira Bianchi Rodrigues Alves¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: ana.amaral-cherain@unesp.br

While morphologically formed at the end of spermatogenesis, sperm are immotile and incapable of fertilization. The acquisition of motility and fertilization ability arises during sperm maturation through epididymal caput, corpus and cauda segments. During sperm maturation, sperm interact with different epididymal microenvironments and are exposed to distinct conditions of osmolarity, pH, and biochemical-molecular composition, undergoing modifications that include the acquisition of molecules, translocation of the cytoplasmic droplet, modification of the plasma membrane, and chromatin stabilization. Although scrotal heat stress promotes sperm alterations by impairing spermatogenesis, there is limited information regarding its effects on sperm maturation. Thus, the objective of this study was to evaluate the morphometry of sperm collected from the caput, corpus, and cauda of the epididymis of bulls exposed to scrotal heat stress. For this, Nellore (*Bos indicus*) bulls were divided into two groups: control (n = 4; CO) and heat-stressed (n = 4; HS). Scrotal heat stress was induced using insulating bags kept on the scrotum for 48 hours. At the end of the stress period, the animals were slaughtered, and the reproductive tract was isolated to obtain sperm from the caput, corpus, and cauda of the epididymis. Following collection, samples were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. Subsequently, 4 µL aliquot of the sample was placed between a slide and coverslip, and images of sperm were obtained under phase-contrast microscopy at 1,000× magnification. Then, 20 sperm from each segment of each bull were analyzed for sperm morphometry using ImageJ® software, including measurements of the sperm head: area, and longitudinal and transverse length; sperm flagellum and midpiece length; and area of cytoplasmic droplet. Analysis of variance (ANOVA) associated with Tukey's test was used for statistical analysis in SAS® Studio, considering the factors segment (caput, corpus and cauda) and treatment (CO vs. HS), as well as their interactions. The level of significance was set at $P \leq 0.05$. There was an interaction between treatment and segment only for flagellum length ($P = 0.0024$), which was lower in sperm from the corpus of the epididymis of HS bulls ($58.09 \pm 0.48 \mu\text{m}$) compared to the caput ($62.34 \pm 0.61 \mu\text{m}$), corpus ($65.248 \pm 1.22 \mu\text{m}$), and cauda ($62.26 \pm 0.44 \mu\text{m}$) segments of CO bulls. The flagellum length of sperm from the caput ($59.33 \pm 0.61 \mu\text{m}$) and cauda ($61.07 \pm 0.94 \mu\text{m}$) of HS bulls was similar to sperm from the corpus of HS and from all segments of CO bulls. There was a treatment effect for sperm head measurements of area ($P=0.04$; CO: $37,15 \pm 0,25^a$ vs. HS: $35,65 \pm 0,34^b \mu\text{m}^2$) and length ($P=0.03$; CO: 9.38 ± 0.03^a vs. HS: $9.28 \pm 0.03^b \mu\text{m}$), which were higher for CO bulls regardless of segment. There was a segment effect for sperm head measurements of area ($P=0,0001$; cab: $35,99 \pm 0,28^b$ vs. cor: $35,34 \pm 0,39^b$ vs. cau: $38,73 \pm 0,35^a \mu\text{m}^2$), longitudinal length ($P=0.001$; caput: 9.39 ± 0.03^a vs. corpus: 9.17 ± 0.05^b vs. cauda: $9.42 \pm 0.04^a \mu\text{m}$), and transverse length ($P<0.0001$; caput: 4.71 ± 0.03^b vs. corpus: 4.62 ± 0.04^b vs. cauda: $4.96 \pm 0.03^a \mu\text{m}$), as well as for cytoplasmic droplet area ($P<0.0001$; cab: $4,48 \pm 0,07^a$ vs. cor: $3,32 \pm 0,14^c$ vs. cau: $3,87 \pm 0,13^b \mu\text{m}^2$). In conclusion, sperm isolated from different epididymal segments display distinct sperm morphometry of the head and cytoplasmic droplet, and scrotal heat stress promotes alterations in sperm head area and longitudinal length. This study provides insights to comprehension of the effects of heat stress on sperm maturation.

Keywords: epididymal, male gamete, motility, morphology and fertility.

Legal authorizations: CEUA: FZEA-USP n° 8312020920.

Acknowledgments and funders: FAPESP 24/13164-6, 21/08759-2 and 19/23685-5. Edital PROPe 8/2024- 16566 - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp - Reserva Recém-Contratados.

Diluyente contendo astaxantina melhora a qualidade espermática pós-descongelamento em touros de corte

Laura Fernanda Sechiroli da Silva¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Leticia Padovani da Silva¹, Marina Oliveira Silva¹, Joice Maria Bazerla Andreta¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, Fabiana Ferreira de Souza¹, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante², Lindsay Unno Gimenes¹, Fabio Morato Monteiro²

¹Universidade Estadual Paulista, ²Instituto de zootecnia
E-mail: laura.fernanda@unesp.br

Os danos celulares decorrentes das alterações de temperatura e osmolaridade durante a criopreservação resultam principalmente na geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), comprometendo a integridade da membrana plasmática e reduzindo a fertilidade espermática. Nesse contexto, antioxidantes têm sido utilizados como estratégia para minimizar tais efeitos, destacando-se a astaxantina (ASTX), devido à sua elevada capacidade antioxidante, descrita como superior à de antioxidantes clássicos como vitaminas C e E, além de atuar simultaneamente nas regiões lipofílica e hidrofílica das membranas celulares, aumentando sua eficiência protetora. Seu mecanismo baseia-se na dissipação de energia do oxigênio singlete e na interação com membranas celulares, garantindo proteção eficiente mesmo sob alto estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de ASTX ao diluyente comercial sobre a qualidade do sêmen bovino após a criopreservação. Foram coletados quatro ejaculados de 12 touros Nelore (*Bos indicus*), totalizando 48 amostras. Após avaliação inicial quanto à cinética espermática, concentração e morfologia, as amostras foram divididas em três grupos: controle (sem ASTX), ASTX1 (1 µmol) e ASTX2 (2 µmol). Após a criopreservação, as amostras foram avaliadas imediatamente após o descongelamento e após 30 minutos de incubação a 46 °C (teste rápido de resistência térmica), quanto à cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, peroxidação lipídica e níveis de estresse oxidativo (TBARS). Observou-se que a motilidade total (P=0,004), a porcentagem de espermatozoides rápidos (P=0,030) e a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (P=0,001) foram maiores nos grupos suplementados com ASTX em comparação ao grupo controle, independentemente do tempo de avaliação. Por outro lado, os parâmetros frequência de batimento cruzado (P=0,007), retilinearidade (P=0,003) e linearidade (P=0,004) foram superiores no grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal e ao potencial de membrana mitocondrial. A peroxidação lipídica foi menor no grupo ASTX1 em comparação ao ASTX2 (P=0,041), enquanto o grupo controle não diferiu dos demais. A avaliação do estresse oxidativo por TBARS, tanto induzido quanto espontâneo, não demonstrou diferenças entre os tratamentos. A menor peroxidação lipídica encontrada na citometria de fluxo na concentração de 1 µmol de ASTX pode justificar a maior motilidade total e a maior proporção de espermatozoides rápidos observadas na cinética espermática, uma vez que os lipídeos das células espermáticas são importantes para a motilidade e a fluidez celular. Os resultados indicam que os efeitos da suplementação com ASTX são dependentes da concentração, sendo a dose de 1 µmol a mais eficaz para melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento, promovendo maior motilidade total e maior proporção de espermatozoides rápidos em relação ao grupo controle, além de reduzir a peroxidação lipídica em comparação à maior dose de ASTX. Assim, a adição de ASTX em baixa concentração ao diluyente comercial apresenta potencial como estratégia para otimizar a qualidade do sêmen bovino criopreservado.

Palavras-chave: astaxantina, criopreservação, estresse oxidativo, Nelore, qualidade espermática

Autorizações legais: CEUA/IZ: Protocolo nº 387-2023

Agradecimentos e financiadores: À CAPES e à FAPESP (Processos nº 2017/50339-5 e 2021/13932-5) pelo apoio financeiro.

Extender Containing Astaxanthin Improves Post-Thaw Sperm Quality in Beef Bulls

Laura Fernanda Sechirolli da Silva¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Leticia Padovani da Silva¹, Marina Oliveira Silva¹, Joice Maria Bazerla Andreta¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, Fabiana Ferreira de Souza¹, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante², Lindsay Unno Gimenes¹, Fabio Morato Monteiro²

¹Universidade Estadual Paulista, ²Instituto de zootecnia
 E-mail: laura.fernanda@unesp.br

Cellular damage resulting from temperature and osmolarity changes during cryopreservation is mainly associated with the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), compromising plasma membrane integrity and reducing sperm fertility. In this context, antioxidants have been used as a strategy to minimize such effects, with astaxanthin (ASTX) standing out due to its high antioxidant capacity, described as superior to that of classical antioxidants such as vitamins C and E, in addition to acting simultaneously in both lipophilic and hydrophilic regions of cellular membranes, increasing its protective efficiency. Its mechanism is based on singlet oxygen energy dissipation and interaction with cellular membranes, ensuring efficient protection even under high oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the effects of adding different concentrations of ASTX to a commercial extender on bovine semen quality after cryopreservation. Four ejaculates were collected from 12 Nelore bulls (*Bos indicus*), totaling 48 samples. After initial evaluation of sperm kinetics, concentration, and morphology, samples were divided into three groups: control (without ASTX), ASTX1 (1 μ mol), and ASTX2 (2 μ mol). After cryopreservation, samples were evaluated immediately after thawing and after 30 minutes of incubation at 46 °C (rapid thermal resistance test) for sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and oxidative stress levels (TBARS). Total motility (P=0,004), percentage of rapid sperm (P=0,030), and amplitude of lateral head displacement (P=0,001) were higher in ASTX-supplemented groups compared to the control group, regardless of evaluation time. Conversely, beat cross frequency (P=0,007), straightness (P=0,003), and linearity (P=0,004) were higher in the control group. No differences were observed among treatments regarding plasma and acrosomal membrane integrity or mitochondrial membrane potential. Lipid peroxidation was lower in the ASTX1 group compared to ASTX2 (P=0,041), while the control group did not differ from the others. Oxidative stress evaluation by TBARS, both induced and spontaneous, showed no differences among treatments. The lower lipid peroxidation observed by flow cytometry at the concentration of 1 μ mol of ASTX may explain the higher total motility and greater proportion of rapid sperm observed in sperm kinetics, since sperm cell lipids are important for motility and membrane fluidity. The results indicate that the effects of ASTX supplementation are concentration-dependent, with the 1 μ mol dose being the most effective in improving post-thaw sperm quality, promoting higher total motility and a greater proportion of rapid sperm compared to the control group, in addition to reducing lipid peroxidation compared to the higher ASTX dose. Thus, the addition of low concentrations of ASTX to a commercial extender shows potential as a strategy to optimize the quality of cryopreserved bovine semen.

Keywords: astaxanthin, cryopreservation, oxidative stress, Nelore, sperm quality

Legal authorizations: CEUA/IZ: Protocol No. 387-2023

Acknowledgments and funders: CAPES and FAPESP (Grant Numbers 2017/50339-5 and 2021/13932-5) for financial support.

Dinâmica dos defeitos espermáticos mais frequentes em touros jovens Nelore e Canchim em diferentes estádios do desenvolvimento reprodutivo

Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Rubens Paes de Arruda³, Alessandra Regina Carrer³, Joedson Dantas Gonçalves^{1,2}, Livia Ferreira Pinho¹, Grazielli Rigo Simões^{4,2}, Alexandre Rossetto Garcia^{1,2}

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,

⁴Centro Universitário Central Paulista

E-mail: giiovannagalhardo@gmail.com

Sabe-se que touros jovens apresentam alta proporção de defeitos espermáticos, que diminuem à medida que a maturidade sexual é alcançada. Entretanto, há um considerável interesse no uso precoce de touros jovens selecionados, a fim de aproveitar sua genética superior. Assim, o objetivo do estudo foi comparar a frequência de defeitos espermáticos em diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo de touros jovens Nelore (*Bos indicus*) e Canchim (*Bos indicus x Bos taurus*). Touros Nelore (Nel, n=22) e Canchim (Can, n=24) foram criados em pastejo rotacionado intensivo (*Urochloa brizantha*) e iniciaram o estudo com peso de 206,4±4,2 e 228,9±8,6 kg, e idade de 7,6±0,1 e 8,9±0,1 meses, respectivamente. O sêmen foi colhido mensalmente por eletroejaculação, com probe adaptada à anatomia de bovinos jovens. Havendo sucesso na obtenção de células espermáticas, o sêmen *in natura* era fixado em solução de paraformaldeído 4% em DPBS. As amostras (200 spz/amostra) foram avaliadas sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e os defeitos espermáticos foram classificados conforme Bloom (1973), sendo os resultados expressos em porcentagem. Os dados foram agrupados de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo: 1º ejaculado (primeiro ejaculado contendo células espermáticas), puberdade (50x10⁶ spz no ejaculado e motilidade progressiva ≥10%) e pós-puberdade (idade ≥19 meses). A análise estatística foi realizada no RStudio por modelos lineares mistos, considerando o efeito fixo da fase reprodutiva e o animal como efeito aleatório para controlar medidas repetidas. Havendo efeito significativo, as médias foram comparadas por meio de testes de comparações múltiplas com ajuste de Tukey (nível de significância: 5%). Houve maior incidência de defeitos maiores no 1º ejaculado e na puberdade do que na pós-puberdade tanto para Nelore (90,2±5,4a vs 79,9±4,9a vs 33,9±4,7b% P<0,0001) quanto para Canchim (86,1±6,3a vs 74,7±4,9a vs 27,5±4,7b% P<0,0001). Houve maior proporção de defeitos menores na pós-puberdade para Nelore (5,7±2,1b vs 5,7±2,0b vs 13,0±1,9a% P=0,012) e Canchim (7,6±2,2c vs 8,3±1,7b vs 14,9±1,6a% P<0,0001). Verificou-se maior incidência de gotas citoplasmáticas proximais na puberdade em comparação ao 1º ejaculado para Nelore (31,9±5,5b vs 52,6±5,0a vs 20,1±4,8b% P<0,0001) e para Canchim (32,9±5,2b vs 49,9±4,0a vs 9,4±3,9b% P<0,0001). Nos touros Nelore, não houve diferença para gotas citoplasmáticas distais entre as fases do desenvolvimento reprodutivo (1,27±1,1 vs 1,73±1,0 vs 3,7±1,0% P=0,21). Entretanto, os touros Canchim apresentaram menor incidência de gota distal no 1º ejaculado (0,5±1,2b vs 2,9±0,9a vs 4,6±0,9a% P=0,04). A incidência de cauda fortemente enrolada não diferiu entre fases nos touros Nelore (11,1±2,3 vs 9,5±2,1 vs 4,6±2,0% P=0,059), enquanto os touros Canchim exibiram maior incidência no 1º ejaculado e puberdade do que na pós-puberdade (9,8±1,9a vs 8,1±1,6a vs 4,0±1,5b% P=0,011). Houve maior incidência de cauda dobrada/enrolada na pós-puberdade em comparação ao 1º ejaculado tanto para touros Nelore (1,1±1,1b vs 2,5±1,0b vs 6,3±0,9a% P=0,001) quanto para Canchim (2,2±1,5b vs 2,5±1,2b vs 8,8±1,1a% P=0,001). Os resultados indicam que houve mudança no perfil dos defeitos espermáticos entre as fases de desenvolvimento. A alta incidência de gota citoplasmática no momento da puberdade se destaca, sugerindo que este aumento tem relação com a entrada à puberdade, principalmente pelo papel desta organela transitória com funções essenciais para a maturação dos espermatozoides. Desta forma, conclui-se que as mudanças nos padrões de patologias espermáticas estão relacionadas as fases puberais dos touros jovens Nelore e Canchim.

Palavras-chave: andrologia animal, bovinos, espermograma, puberdade, precocidade sexual.

Autorizações legais: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CEUA/CPPE PRT 02/2023) e Universidade de São Paulo (CEUAX 6157180523).

Agradecimentos e financiadores: À FAPESP (Processo 2021/04335-3), ao CNPq (Processos 312295/2022-7, 137738/2025-0, 402044/2025-8) e a CAPES (Código de Financiamento 001).

Dynamics of the most frequent sperm defects in young Nelore and Canchim bulls at different stages of reproductive development

Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Rubens Paes de Arruda³, Alessandra Regina Carrer³, Joedson Dantas Gonçalves^{1,2}, Livia Ferreira Pinho¹, Grazielli Rigo Simões^{4,2}, Alexandre Rossetto Garcia^{1,2}

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ⁴Centro Universitário Central Paulista
E-mail: giovannagalhardo@gmail.com

Young bulls have a high incidence of sperm defects, which decrease as they reach sexual maturity. However, there is considerable interest in the early use of selected yearling bulls to capitalize on their superior genetics. Thus, the objective of this study was to compare the frequency of sperm defects at different stages of reproductive development in young Nelore (*Bos indicus*) and Canchim (*Bos indicus* x *Bos taurus*) bulls. Nelore (Nel, n=22) and Canchim (Can, n=24) bulls were raised on intensive rotational grazing (*Urochloa brizantha*) and entered the study weighing 206.4±4.2 and 228.9±8.6 kg, and at 7.6±0.1 and 8.9±0.1 months of age, respectively. Semen was collected monthly via electroejaculation using a probe adapted to the anatomy of young cattle. When sperm cells were successfully obtained, the fresh semen was fixed in a 4% paraformaldehyde solution in DPBS. The samples (200 spermatozoa/sample) were evaluated under differential interference contrast microscopy (DIC), and sperm defects were classified according to Bloom (1973), with results expressed as percentages. The data were grouped according to the different stages of reproductive development: first ejaculate (first ejaculate containing sperm cells), puberty (50 × 10⁶ sperm cells in the ejaculate and progressive motility ≥10%), and post-puberty (age ≥19 months). Statistical analysis was performed in RStudio using mixed-effects models, with the reproductive phase as a fixed effect and the animal as a random effect to account for repeated measurements. If significant effects were found, means were compared using Tukey's adjusted multiple comparison tests (significance level: 5%). There was a higher incidence of major defects in the first ejaculate and at puberty than in the post-pubertal period for both Nelore (90.2±5.4a vs. 79.9±4.9a vs. 33.9±4.7b% P<0.0001) and Canchim (86.1±6.3a vs 74.7±4.9a vs 27.5±4.7b% P<0.0001). There was a higher proportion of minor defects in the post-pubertal period for Nelore (5.7±2.1b vs 5.7±2.0b vs 13.0±1.9a% P=0.012) and Canchim (7.6±2.2c vs 8.3±1.7b vs 14.9±1.6a% P<0.0001). A higher incidence of proximal cytoplasmic droplets was observed at puberty compared to the first ejaculate for Nelore (31.9±5.5b vs 52.6±5.0a vs 20.1±4.8b% P<0.0001) and for Canchim (32.9±5.2b vs 49.9±4.0a vs 9.4±3.9b% P<0.0001). In Nelore bulls, there was no difference in distal cytoplasmic droplets among the stages of reproductive development (1.27±1.1 vs 1.73±1.0 vs 3.7±1.0% P=0.21). However, Canchim bulls showed a lower incidence of distal gout in the first ejaculate (0.5±1.2b vs. 2.9±0.9a vs. 4.6±0.9a%, P=0.04). The incidence of coiled tails did not differ between phases in Nelore bulls (11.1±2.3 vs 9.5±2.1 vs 4.6±2.0% P=0.059). In contrast, Canchim bulls exhibited a higher incidence in the first ejaculate and at puberty than in the post-puberty phase (9.8±1.9a vs 8.1±1.6a vs 4.0±1.5b% P=0.011). There was a higher incidence of bent tails in the post-puberty period compared to the first ejaculate for both Nelore bulls (1.1±1.1b vs. 2.5±1.0b vs. 6.3±0.9a% P=0.001) as for Canchim (2.2±1.5b vs 2.5±1.2b vs 8.8±1.1a% P=0.001). The results indicate a change in the profile of sperm defects between developmental phases. The high incidence of cytoplasmic droplets at puberty is notable, suggesting a link with the onset of puberty. This is mainly due to the essential role of these transient organelles in sperm maturation. Thus, it can be concluded that changes in sperm pathology patterns are related to the pubertal stages of young Nelore and Canchim bulls.

Keywords: animal andrology, cattle, semen analysis, puberty, precocious puberty.

Legal authorizations: Brazilian Agricultural Research Corporation (CEUA/CPPSE PRT 02/2023) and University of São Paulo (CEUAX 6157180523).

Acknowledgments and funders: To FAPESP (Grant No. 2021/04335-3), CNPq (Grant Nos. 312295/2022-7, 137738/2025-0, 402044/2025-8), and CAPES (Funding Code 001).

Efeito da associação entre caseína, colesterol e concentrações reduzidas de gema de ovo sobre a cinética de espermatozoides bovinos criopreservados

Pedro Henrique de Oliveira Baldini¹, Amanda Carvalho Silva¹, Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Carla Patricia Teodoro de Carvalho², José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Eunice Oba¹, Gabriel Augusto Monteiro¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Seleon Biotecnologia
 E-mail: pedro.henrique-oliveira@unesp.br

A refrigeração e a criopreservação do sêmen bovino submetem os espermatozoides a estresses osmóticos e térmicos que causam danos estruturais e funcionais. Tradicionalmente, utiliza-se a gema de ovo como agente crioprotetor, mas o seu uso apresenta riscos de biossegurança e variabilidade na composição bioquímica. Moléculas alternativas, como o colesterol transportado por ciclodextrinas (CLC) e as proteínas do leite, como a caseína, demonstram efeitos benéficos à membrana plasmática. O objetivo deste estudo preliminar foi identificar a concentração mínima necessária de gema de ovo (2%, 10% ou 20%) associada a diluentes seminais à base de caseína, com ou sem adição de colesterol, sobre a cinética de espermatozoides bovinos criopreservados. Para tal, foram utilizados ejaculados de 9 touros aptos à reprodução, colhidos por meio de vagina artificial. O sêmen foi diluído e processado em sete grupos experimentais: o grupo controle comercial à base de gema de ovo (BotuBov®; BV); diluentes à base de caseína com adição de colesterol contendo 2% (CC2), 10% (CC10) e 20% (CC20) de gema de ovo; e diluentes à base apenas de caseína contendo 2% (C2), 10% (C10) e 20% (C20) de gema de ovo. Após o processamento e a congelação das amostras, a cinética espermática foi avaliada pós-descongelamento por sistema computadorizado (CASA), analisando os parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Velocidade Média de Trajeto (VAP), Velocidade Retilínea (VSL), Velocidade Curvilínea (VCL), Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH), Frequência de Batimento de cauda (BCF), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP). Para determinar o efeito dos tratamentos (diluente) sobre os parâmetros avaliados, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Quando observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), as médias dos grupos foram comparadas pelo teste post-hoc de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância adotado para a rejeição da hipótese nula em todas as análises foi de 5%. A ANOVA indicou efeito significativo dos tratamentos para MT, MP, VAP, VSL, VCL, BCF, STR e RAP ($p < 0,05$), não havendo diferença para ALH e LIN ($p > 0,05$). Para MT e MP, os diluentes CC10 ($77,10 \pm 12,56\%$ e $58,20 \pm 9,52\%$) e CC20 ($72,67 \pm 19,90\%$ e $48,50 \pm 12,14\%$) mantiveram índices elevados, não diferindo estatisticamente do controle BV ($74,67 \pm 17,01\%$ e $52,50 \pm 12,32\%$). O grupo C2 apresentou as menores taxas de MT ($37,83 \pm 8,75\%$) e MP ($26,33 \pm 6,38\%$), diferindo significativamente do grupo CC10 e do controle. Na cinética detalhada, os grupos CC10 e C10 proporcionaram maior VAP ($108,00 \pm 10,51 \mu\text{m/s}$ e $107,88 \pm 9,95 \mu\text{m/s}$) e VCL ($168,80 \pm 19,46 \mu\text{m/s}$ e $176,12 \pm 15,71 \mu\text{m/s}$), apresentando valores superiores em relação ao controle BV (VAP: $89,33 \pm 10,05 \mu\text{m/s}$; VCL: $137,83 \pm 23,15 \mu\text{m/s}$) e ao grupo C2. A VSL também foi superior no CC10 ($88,60 \pm 10,82 \mu\text{m/s}$) em comparação ao BV ($71,17 \pm 5,71 \mu\text{m/s}$). Adicionalmente, o grupo CC2 ($29,00 \pm 3,93 \text{ Hz}$) apresentou maior BCF que o controle BV ($20,00 \pm 5,06 \text{ Hz}$), enquanto na STR, o CC2 ($83,25 \pm 1,75\%$) foi superior ao CC20 ($76,83 \pm 2,48\%$). A porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) manteve-se em níveis altos no CC10 ($72,70 \pm 12,72\%$), assemelhando-se ao controle BV ($70,67 \pm 16,79\%$) e diferindo do C2, que obteve o menor valor ($35,00 \pm 8,94\%$). A associação de 10% de gema de ovo a um diluente à base de caseína suplementado com colesterol (CC10) demonstrou ser promissora, mantendo a motilidade e a porcentagem de espermatozoides rápidos em níveis semelhantes aos do controle, enquanto potencializou de forma significativa os parâmetros de velocidades. Esses achados indicam a viabilidade da redução das concentrações de gema de ovo quando combinada ao efeito sinérgico do colesterol, sem comprometer a integridade cinética do sêmen bovino criopreservado.

Palavras-chave: cinética espermática, caseína, colesterol, gema de ovo.

Autorizações legais: Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da FMVZ-UNESP Botucatu sob o protocolo nº 000.440 (vigência 30/07/2025 - 30/03/2026).

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem à Botupharma, Seleon Biotecnologia e ST Genetics pela parceria e suporte, que foram fundamentais para a viabilização do estudo.

Effect of the combination of casein, cholesterol, and reduced concentrations of egg yolk on the kinetics of cryopreserved bovine spermatozoa

Pedro Henrique de Oliveira Baldini¹, Amanda Carvalho Silva¹, Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Carla Patricia Teodoro de Carvalho², José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Eunice Oba¹, Gabriel Augusto Monteiro¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Seleon Biotecnologia
E-mail: pedro.henrique-oliveira@unesp.br

Cooling and cryopreservation of bovine semen subject spermatozoa to osmotic and thermal stresses that cause structural and functional damage. Traditionally, egg yolk is used as a cryoprotective agent; however, its use presents biosecurity risks and variability in biochemical composition. Alternative molecules, such as cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) and milk proteins, such as casein, demonstrate beneficial effects on the plasma membrane. The objective of this preliminary study was to identify the minimum necessary concentration of egg yolk (2%, 10%, or 20%) combined with casein-based semen extenders, with or without the addition of cholesterol, on the kinetics of cryopreserved bovine spermatozoa. For this purpose, ejaculates from 9 reproductively sound bulls, collected via an artificial vagina, were used. The semen was extended and processed into seven experimental groups: a commercial egg yolk-based control group (BotuBov®; BV); casein-based extenders supplemented with cholesterol containing 2% (CC2), 10% (CC10), and 20% (CC20) egg yolk; and strictly casein-based extenders containing 2% (C2), 10% (C10), and 20% (C20) egg yolk. Following the processing and freezing of the samples, sperm kinetics were evaluated post-thawing using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system, analyzing the parameters of Total Motility (TM), Progressive Motility (PM), Average Path Velocity (VAP), Straight-Line Velocity (VSL), Curvilinear Velocity (VCL), Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH), Beat Cross Frequency (BCF), Straightness (STR), Linearity (LIN), and percentage of rapid spermatozoa (RAP). To determine the effect of the treatments (extenders) on the evaluated parameters, the data were subjected to Analysis of Variance (ANOVA). When significant statistical differences were observed ($p < 0.05$), group means were compared using Tukey's post-hoc multiple comparison test. The significance level adopted for rejecting the null hypothesis in all analyses was 5%. The ANOVA indicated a significant effect of treatments for TM, PM, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, and RAP ($p < 0.05$), with no difference for ALH and LIN ($p > 0.05$). For TM and PM, the CC10 ($77.10 \pm 12.56\%$ and $58.20 \pm 9.52\%$) and CC20 ($72.67 \pm 19.90\%$ and $48.50 \pm 12.14\%$) extenders maintained high indices, not differing statistically from the BV control ($74.67 \pm 17.01\%$ and $52.50 \pm 12.32\%$). The C2 group exhibited the lowest rates of TM ($37.83 \pm 8.75\%$) and PM ($26.33 \pm 6.38\%$), differing significantly from the CC10 group and the control. Regarding detailed kinetics, the CC10 and C10 groups provided higher VAP ($108.00 \pm 10.51 \mu\text{m/s}$ and $107.88 \pm 9.95 \mu\text{m/s}$) and VCL ($168.80 \pm 19.46 \mu\text{m/s}$ and $176.12 \pm 15.71 \mu\text{m/s}$), displaying higher values compared to the BV control (VAP: $89.33 \pm 10.05 \mu\text{m/s}$; VCL: $137.83 \pm 23.15 \mu\text{m/s}$) and the C2 group. The VSL was also higher in CC10 ($88.60 \pm 10.82 \mu\text{m/s}$) compared to BV ($71.17 \pm 5.71 \mu\text{m/s}$). Additionally, the CC2 group ($29.00 \pm 3.93 \text{ Hz}$) showed a higher BCF than the BV control ($20.00 \pm 5.06 \text{ Hz}$), while for STR, CC2 ($83.25 \pm 1.75\%$) was superior to CC20 ($76.83 \pm 2.48\%$). The percentage of rapid spermatozoa (RAP) remained at high levels in CC10 ($72.70 \pm 12.72\%$), being similar to the BV control ($70.67 \pm 16.79\%$) and differing from C2, which obtained the lowest value ($35.00 \pm 8.94\%$). The combination of 10% egg yolk with a casein-based extender supplemented with cholesterol (CC10) proved to be promising, maintaining motility and the percentage of rapid spermatozoa at levels similar to the control, while significantly enhancing velocity parameters. These findings indicate the feasibility of reducing egg yolk concentrations when combined with the synergistic effect of cholesterol, without compromising the kinetic integrity of cryopreserved bovine semen.

Keywords: sperm kinetics, casein, cholesterol, egg yolk.

Legal authorizations: This study was approved by CEUA FMVZ-UNESP Botucatu under protocol No. 000.440 (valid: 07/30/25-03/30/26).

Acknowledgments and funders: The authors thank Botupharma, Seleon Biotecnologia, and ST Genetics for their partnership and support, which were essential for the feasibility of this study.

Efeito das Estações do Ano e da Composição Genética na Qualidade Espermática de Touros de Corte em Central de Coleta

Diego Corrêa Silveira¹, Marcelo Brandi Vieira¹, Fábio Gularte Barreto¹, Jeaniffer Melgarejo Vieira¹, Lionso Furtado Ribeiro¹, Eduardo Schmitt², Cassio Cassal Brauner²

¹Progen Inseminação Artificial Ltda, ²Universidade Federal de Pelotas
E-mail: diego@progen.agr.br

As diferenças relacionadas as mudanças de temperatura e umidade podem interferir nos resultados de produção e qualidade espermática em touros de corte. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a variação semanal da qualidade seminal ao longo de um ano e sua possível relação com fatores climáticos, tipo racial e suas interações. Foi realizada uma análise de dados retrospectivos de coletas semanais durante o ano de 2025 de 72 touros de 8 raças de bovinos de corte mantidos em uma central de coleta de sêmen no município de Dom Pedrito-RS, totalizando assim 7148 coletas. Os animais eram mantidos em piquetes individuais com pastagem e acesso a cochos para alimentação e água, bem como sombreamento artificial. Os dados climatológicos foram obtidos em uma estação meteorológica no local do estudo. O sistema de coleta de sêmen utilizado foi de vagina artificial e as análises de morfologia foram realizadas através de microscopia de contraste de fase em aumento de 100x, diluídas em alíquotas de 40 a 50 µL em solução de formalina citrato a 3% e preparadas em lâmina úmida. Foram contadas 100 células por lâmina, a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais foi calculada e os defeitos foram classificados em maiores, menores e totais. Dois grupos genéticos foram formados de acordo com as raças: Europeu (n=37; Angus, Hereford, Charolês e Devon) e Influência (n=35; Brangus e Braford) sendo este influenciado por genética zebuína. Para as análises estatísticas foram considerados os fatores fixos o grupo genético dos touros e as quatro estações do ano (verão, outono, primavera e verão) e suas interações (GLM ANOVA; teste de Tukey). As variáveis seminais analisadas foram as porcentagens de patologias menores (cabeça isolada, cauda dobrada), patologias maiores (cabeças anormais, acrossoma, diadema e vacúolos, gota citoplasmática proximal e peça intermediária) e patologias totais (soma de patologias maiores e menores). Os dados climatológicos para cálculo da média de ITU (índice de temperatura e umidade) foram comparados nas diferentes estações do ano e foram diferentes ($P < 0,0001$), sendo de $73,9 \pm 0,7$; $61,0 \pm 0,2$; $54,8 \pm 0,2$ e $65,6 \pm 0,2$, respectivamente para verão, outono, inverno e primavera. Houve efeito ($P < 0,001$) do grupo racial sobre todas as variáveis analisadas, com uma predominância de melhores resultados para touros do grupo Europeu. Também houve efeito ($P < 0,001$) de estação do ano sobre todas as variáveis estudadas, sendo que o inverno se destacou como a época de melhores resultados. Na interação entre estação do ano e grupo racial, não houve efeito ($P > 0,05$) sobre patologias totais. Houve tendência ($P = 0,07$) de interação para patologias menores. A porcentagem de patologias maiores no verão no grupo Influência foi de $17,9 \pm 0,3$ e no outono de $17,0 \pm 0,3$; sendo ambas maiores ($P > 0,001$) que no grupo Europeu que foi de $15,2 \pm 0,4$ e $14,5 \pm 0,3$ nas mesmas estações. Já durante a primavera e inverno as porcentagens não diferiram ($P > 0,05$), sendo $14,1 \pm 0,3$ e $13,7 \pm 0,2$, respectivamente para o grupo Europeu e de $14,2 \pm 0,2$ no inverno para o grupo Influência, sendo que o grupo Influência na primavera apresentou porcentagem de $15,4 \pm 0,3$ diferindo ($P > 0,001$) dos demais grupos. Maiores exposições a altas temperaturas e umidade características de maior ocorrência ao final da primavera até início do outono, conjuntamente ao fato de modificações na qualidade seminal repercutirem de forma dessincronizada em relação ao desafio, acabam por determinar que verão e outono são as estações mais desafiadoras para ambos os grupos, principalmente o grupo influenciado pela genética zebuína. Embora fosse esperado resultado oposto, talvez o efeito isolado de raça observado inicialmente na avaliação tenha mantido sua extensão ao longo das estações. Conclui-se que a variação semanal da qualidade seminal ao longo de um ano é afetada pelas variações climáticas predominantes e características de cada estação do ano, sendo que o tipo racial responde de formas diferentes nas diferentes épocas.

Palavras-chave: bovinos, época, exame andrológico, temperatura.

Autorizações legais: CEUA/UFPel: 7017

Effect of Seasons and Genetic Composition on Sperm Quality of Beef Bulls in a Semen Collection Center

Diego Corrêa Silveira¹, Marcelo Brandi Vieira¹, Fábio Gularte Barreto¹, Jeaniffer Melgarejo Vieira¹, Lionso Furtado Ribeiro¹, Eduardo Schmitt², Cassio Cassal Brauner²

¹Progen Inseminação Artificial Ltda, ²Universidade Federal de Pelotas
 E-mail: diego@progen.agr.br

Differences related to changes in temperature and humidity can interfere with sperm production and quality results in beef bulls. Therefore, the objective of this study was to evaluate the weekly variation in semen quality over a year and its possible relationship with climatic factors, breed type, and their interactions. A retrospective data analysis was performed on weekly collections during the year 2025 from 72 bulls of 8 beef cattle breeds kept at a semen collection center in the municipality of Dom Pedrito-RS, totaling 7148 collections. The animals were kept in individual paddocks with pasture and access to feed and water troughs, as well as artificial shade. Climatological data were obtained from a meteorological station at the study site. The semen collection system used was an artificial vagina, and morphological analyses were performed using phase-contrast microscopy at 100x magnification. Semen was diluted in 40-50 μ L aliquots in 3% citrate formalin solution and prepared on a wet slide. One hundred cells were counted per slide, the percentage of morphologically normal spermatozoa was calculated, and defects were classified as major, minor, and total. Two genetic groups were formed according to breed: European (n=37; Angus, Hereford, Charolais, and Devon) and Influence (n=35; Brangus and Braford), the latter influenced by Zebu genetics. For statistical analyses, the fixed factors considered were the genetic group of the bulls and the four seasons of the year (summer, autumn, spring, and summer) and their interactions (GLM ANOVA; Tukey test). The seminal variables analyzed were the percentages of minor pathologies (isolated head, bent tail), major pathologies (abnormal heads, acrosome, diadem and vacuoles, proximal cytoplasmic droplet and midpiece) and total pathologies (sum of major and minor pathologies). Climatological data for calculating the mean THI (temperature and humidity index) were compared across different seasons and were different ($P < 0.0001$), being 73.9 ± 0.7 ; 61.0 ± 0.2 ; 54.8 ± 0.2 and 65.6 ± 0.2 , respectively for summer, autumn, winter and spring. There was an effect ($P < 0.001$) of the breed group on all variables analyzed, with a predominance of better results for bulls from the European group. There was also a seasonal effect ($P < 0.001$) on all variables studied, with winter standing out as the time of year with the best results. In the interaction between season and racial group, there was no effect ($P > 0.05$) on total pathologies. There was a trend ($P = 0.07$) of interaction towards minor pathologies. The percentage of major pathologies in the summer in the Influence group was 17.9 ± 0.3 and in the autumn 17.0 ± 0.3 ; both being higher ($P > 0.001$) than in the European group, which was 15.2 ± 0.4 and 14.5 ± 0.3 in the same seasons. During spring and winter, the percentages did not differ ($P > 0.05$), being 14.1 ± 0.3 and 13.7 ± 0.2 , respectively, for the European group and 14.2 ± 0.2 in winter for the Influence group. The Influence group in spring showed a percentage of 15.4 ± 0.3 , differing ($P > 0.001$) from the other groups. Greater exposure to high temperatures and humidity, characteristic of late spring to early autumn, together with the fact that changes in semen quality are asynchronously reflected in relation to the challenge, ultimately determine that summer and autumn are the most challenging seasons for both groups, especially the group influenced by Zebu genetics. Although the opposite result was expected, perhaps the isolated breed effect initially observed in the evaluation maintained its extent throughout the seasons. It can be concluded that the weekly variation in semen quality throughout the year is affected by the prevailing climatic variations and characteristics of each season, with the breed type responding differently at different times of the year.

Keywords: cattle, period, andrological examination, temperature.

Legal authorizations: CEUA/UFPel: 7017

Efeito da suplementação com Pirroloquinolina Quinona (PQQ) pós-descongelamento no sêmen bovino

Henrique Thomazo Frias¹, Ken Kawaoka Nagai², Roberta Ferreira Leite¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Luís Varela Brasileiro de Alcantara², Ester Lourdes Barros dos Santos², Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP
E-mail: hthomazo@gmail.com

O uso de biotecnologias reprodutivas, como o congelamento e comercialização de doses de sêmen, impulsiona a eficiência no manejo reprodutivo de bovinos. Esse processo de congelamento traz desafios aos espermatozoides como alterações na membrana plasmática e no metabolismo devido à formação de cristais de gelo, alterações de osmolaridade e estresse oxidativo. Esse último ocorre quando há um desbalanço entre mecanismos antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs oxidam componentes celulares, danificando especialmente as membranas espermáticas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados. A mitocôndria pode produzir EROs como subprodutos na cadeia de transporte de elétrons, e essa produção é intensificada com disfunções mitocondriais induzidas pela criopreservação, em efeito bola-de-neve que perpetua após o descongelamento, podendo prejudicar a fertilidade dessas doses. As quinonas, moléculas antioxidantes que interagem na cadeia de transporte de elétrons, são promissoras por otimizarem a produção de energia e combaterem a formação dessas EROs mitocondriais. A pirroloquinolina quinona (PQQ) é uma quinona encontrada em diversos organismos, possui ação antioxidante e está também envolvida no metabolismo energético mitocondrial. A suplementação em diluidores de sêmen com essa molécula, na tentativa de mitigar os processos oxidativos de origem mitocondrial, pode aumentar a eficiência reprodutiva dessas doses. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição da PQQ após o descongelamento de amostras de sêmen bovino nos atributos espermáticos durante um período de incubação. Metodologia: Foram realizadas incubações com diferentes concentrações de PQQ em amostras de sêmen bovino descongeladas. Para isso, 8 palhetas de touros diferentes (n=8) foram descongeladas, cada uma divididas em 4 alíquotas de igual volume e concentração espermática e adicionadas de diferentes concentrações de PQQ (0, 100nM, 1.000nM e 10.000nM), sendo mantidas a 37°C por 180 minutos. A cada 60 minutos, foi avaliada a cinética espermática no sistema CASA (IVOS® II, Hamilton Thorne Inc., USA) em lâminas Leja®. Também foi realizada a avaliação da atividade mitocondrial por meio da técnica citoquímica com 3'3 diaminobenzidina (DAB) após 180 minutos de incubação, sendo as células classificadas de acordo com a coloração da peça intermediária (DAB I-IV). Foi realizada uma análise de variância seguida pelo teste de Duncan para a comparação de grupos ($p \leq 0,05$) e os valores correspondem à média \pm erro padrão da média. Resultados: não foram observadas diferenças na cinética espermática entre os grupos em nenhum tempo avaliado. Os grupos com 100 e 1.000 nM de PQQ resultaram em maior IAM (Índice de Atividade Mitocondrial, 80,9 \pm 1,7a e 81,3 \pm 1,5a respectivamente) em comparação ao grupo Controle (73,4 \pm 2,1b). Esse resultado foi acompanhado por uma maior frequência de células com alta atividade mitocondrial nas doses de 1.000 nM (DAB I, 68,8%b) vs o grupo controle (52,2%a). Além disso, o grupo controle apresentou maior proporção de células com atividade mitocondrial intermediária (DAB II, 33,8%a) contra o grupo 1.000nM (23,2%b). Esses resultados podem ser reflexo da ação da molécula na atividade mitocondrial dos espermatozoides. Porém, essa maior atividade não influenciou na cinética espermática das amostras ao final da incubação, dada a ausência de diferença estatística entre os grupos (Motilidade Total, Controle: 48,7 \pm 8,5; 100nM: 55,3 \pm 8,6; 1.000nM: 52,2 \pm 8,5 e 10.000nM: 48,1 \pm 8,3). Por serem amostras com alta qualidade pós-descongelamento (Motilidade Total e Motilidade Progressiva de 72,6 \pm 6,5 e 38,3 \pm 4,2 respectivamente, no t=0), é possível que o período de incubação não tenha sido o suficiente para as amostras entrarem em desbalanço oxidativo. Os resultados desse estudo sugerem que a suplementação com a quinona possa ser benéfica em amostras de sêmen descongeladas com baixa atividade mitocondrial, além da possibilidade de sua aplicação pré-congelamento.

Palavras-chave: antioxidante, mitocôndria, PQQ, bovinos, estresse oxidativo.

Autorizações legais: As amostras utilizadas foram doadas pela Central Bela Vista Pecuaria Ltda.

Agradecimentos e financiadores: À Central Bela Vista Pecuaria Ltda. pela doação das amostras criopreservadas utilizadas até o momento.

Effect of post-thaw supplementation with Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) on bovine semen

Henrique Thomazo Frias¹, Ken Kawaoka Nagai², Roberta Ferreira Leite¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Luís Varela Brasileiro de Alcantara², Ester Lourdes Barros dos Santos², Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP
E-mail: hthomazo@gmail.com

The use of reproductive biotechnologies, such as the freezing and commercialization of semen doses, drives efficiency in bovine reproductive management. This freezing process presents challenges to spermatozoa, including alterations in the plasma membrane and metabolism due to ice crystal formation, changes in osmolarity, and oxidative stress. The latter occurs when there is an imbalance between antioxidant mechanisms and reactive oxygen species (ROS). ROS oxidize cellular components, specifically damaging sperm membranes, which are rich in polyunsaturated fatty acids. Mitochondria can produce ROS as byproducts of the electron transport chain, and this production is intensified by cryopreservation-induced mitochondrial dysfunction in a snowball effect that persists after thawing, potentially impairing the fertility of these doses. Quinones, antioxidant molecules that interact with the electron transport chain, are promising for optimizing energy production and combating the formation of these mitochondrial ROS. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a quinone found in various organisms that possesses antioxidant action and is also involved in mitochondrial energy metabolism. Supplementing semen extenders with this molecule, in an attempt to mitigate mitochondrial oxidative processes, may increase the reproductive efficiency of these doses. The objective of this study was to evaluate the effect of adding PQQ after thawing bovine semen samples on sperm attributes during an incubation period. Methodology: Incubations were performed with different concentrations of PQQ in thawed bovine semen samples. For this, 8 straws from different bulls (n=8) were thawed, each divided into 4 aliquots of equal volume and sperm concentration, and supplemented with different concentrations of PQQ (0, 100nM, 1,000nM, and 10,000nM), maintained at 37°C for 180 minutes. Every 60 minutes, sperm kinetics were evaluated using the CASA system (IVOS II, Hamilton Thorne Inc., USA) in Leja slides. Mitochondrial activity was also evaluated using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) cytochemical technique after 180 minutes of incubation, with cells classified according to the staining of the midpiece (DAB I-IV). Analysis of variance followed by Duncan's test was performed for group comparison ($p \leq 0.05$); values correspond to mean \pm standard error of the mean. Results: No differences were observed in sperm kinetics between groups at any evaluated time point. The 100 and 1,000 nM PQQ groups resulted in a higher Mitochondrial Activity Index (MAI) ($80.9 \pm 1.7a$ and $81.3 \pm 1.5a$, respectively) compared to the Control group ($73.4 \pm 2.1b$). This result was accompanied by a higher frequency of cells with high mitochondrial activity in the 1,000 nM doses (DAB I, 68.8%*b*) vs. the control group (52.2%*a*). Furthermore, the control group showed a higher proportion of cells with intermediate mitochondrial activity (DAB II, 33.8%*a*) compared to the 1,000 nM group (23.2%*b*). These results may reflect the action of the molecule on sperm mitochondrial activity. However, this higher activity did not influence the sperm kinetics of the samples at the end of incubation, given the absence of statistical difference between groups (Total Motility, Control: 48.7 ± 8.5 ; 100nM: 55.3 ± 8.6 ; 1,000nM: 52.2 ± 8.5 , and 10,000nM: 48.1 ± 8.3). Since these were high-quality post-thaw samples (Total Motility and Progressive Motility of 72.6 ± 6.5 and 38.3 ± 4.2 , respectively, at $t=0$), it is possible that the incubation period was not sufficient for the samples to enter oxidative imbalance. The results of this study suggest that quinone supplementation may be beneficial in thawed semen samples with low mitochondrial activity, in addition to the possibility of its use pre-freezing.

Keywords: cattle, antioxidant, mitochondria, PQQ, oxidative stress.

Legal authorizations: The samples utilized in this study were donated by Central Bela Vista Pecuaria Ltda.

Acknowledgments and funders: To Central Bela Vista Pecuaria Ltda. for the donation of the cryopreserved samples used to date.

Efeito do estímulo gonadotrófico no período pré-púbere inicial sobre os parâmetros andrológicos e indicadores de perfusão testicular em tourinhos Nelore

Mateus Bernardy¹, Celso Gabriel Ritz¹, Lucas Nascimento Stresser¹, Vinicius Mateus Santana Neves Araujo¹, João Pedro Terra Prado Borges², Denis Vinicus Bonato², Marcelo Marcondes Seneda¹, Fábio Morotti¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Paranaense
E-mail: mateusbernardy.mb@gmail.com

Os picos pré-puberais de gonadotrofinas são essenciais à maturação sexual, mas a modulação endócrina precoce em machos bovinos ainda é pouco compreendida, ao contrário do amplo uso em fêmeas. Este estudo avaliou o efeito do estímulo gonadotrófico com GnRH e hCG na janela pré-puberal sobre parâmetros andrológicos e índices dopplervelocimétricos da artéria suprategesticular em tourinhos. O estudo incluiu 44 bezerros Nelore contemporâneos, criados com a mãe até o desmame em condições semi-intensivas. Aos 3m (90±15 dias), usando peso e descendência paterna para blocagem, foram distribuídos em 3 grupos: Controle (NaCl 0,9%; IM; n=15), GnRH (300 µg de gonadorelina; IM; Ovalyse®, Zoetis, Brasil; n=15) e hCG (1500 UI; IM; Vetcor®, Ceva, Brasil; n=14). O tratamento foi repetido 7 dias depois, e os bezerros permaneceram com as mães até o desmame (8m). Em seguida, os garrotes foram mantidos em pastagem de *Urochloa brizantha* cv. MG-5, com água e suplemento mineral *ad libitum*, sem suplementação adicional. O peso e o perímetro escrotal (PE) foram aferidos a cada 2m (3 aos 18m). Aos 12, 14, 16 e 18m, foram realizadas as mensurações do volume testicular (VT), a avaliação dos índices dopplervelocimétricos da artéria suprategesticular [velocidade média (VM cm/s), índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) - Sonoscape S8®, Brasil] e as colheitas de sêmen por eletroejaculação (Autojac3®, Neovet, Brasil) para análise da cinemática espermática (AndroScope®, Minitube, Alemanha). Variáveis contínuas longitudinais foram analisadas por modelos lineares mistos no R considerando efeito de tratamento, tempo e interação (post-hoc de Tukey e slicing) e a dinâmica puberal por análise de sobrevivência (Kaplan-Meier) e teste de Fisher (P<0,05). Houve efeito da idade (P<0,0001) sobre o peso e o PE. O peso aumentou de 114±7 kg (3m) para 409±7 kg (18m), sem efeito de tratamento (P=0,81) ou interação (P=0,34). O PE apresentou padrão semelhante, aumentando de 13,9±0,6 cm (3m) e 20,3±0,6 cm (12m) para 29,9±0,6 cm (18m), sem efeito de tratamento (P=0,17) ou interação (P=0,42). Aos 16m, porém, o grupo hCG apresentou maior PE (28,0±0,6cm) que GnRH (25,9±0,6cm) e Controle (26,1±0,6cm). O VT foi influenciado pela idade (P<0,0001), sem efeito de tratamento (P=0,36) ou interação (P=0,56). Aos 16m, o grupo hCG apresentou tendência (P=0,09) de maior VT em relação ao GnRH. A VM aumentou progressivamente (P<0,0001) desde os 12m até o estabelecimento da puberdade em todos os grupos. Além disso, observou-se interação tratamento*tempo (P=0,05), revelando que, aos 16m, a VM foi superior nos grupos GnRH (13,30±0,64) e hCG (13,20±0,61) em comparação ao Controle (11,50±0,64). Não houve efeito do tratamento (P=0,35) ou interação (P=0,84) sobre o IR, mas houve efeito de tempo (P=0,02), com médias atingindo um pico aos 14m (0,63±0,01) e redução significativa aos 16m (0,57±0,01) em todos os grupos. O IP também reduziu com o avanço da idade (P=0,01) em todos os grupos. No entanto, houve uma tendência de efeito de tratamento (P=0,07), evidenciada pela manutenção de um IP mais alto (P<0,05) no grupo hCG (0,79±0,06 e 0,74±0,06) em comparação ao Controle (0,58±0,06 e 0,55±0,05) aos 14 e 18m, respectivamente. Motilidades total e progressiva não foram afetadas pelo tratamento e interação (P>0,10), apenas pela idade (P<0,0001). A motilidade total aumentou de 14,3% (14m) para 58,0% (18m), e a progressiva de 6,6% para 48,7%. Aos 12m, houve produção seminal avaliável apenas no grupo hCG. Aos 16m, o grupo hCG atingiu 100% de puberdade (14/14), superior ao Controle (53,3%; 8/15; P=0,006), sem diferir do GnRH (80%; 12/15). Em conclusão, a maioria das variáveis foi influenciada pela idade, como esperado. Os indicadores de perfusão testicular oscilaram acompanhando a dinâmica puberal, mostrando-se bons marcadores de puberdade. O tratamento com hCG foi promissor, resultando, aos 16m, em maior PE, VT e VM da artéria suprategesticular, além de antecipar a puberdade em relação ao controle.

Palavras-chave: indução de puberdade, precocidade, touro, doppler espectral, cinemática espermática.

Autorizações legais: CEUA/Uel: 222022; 86057-970

Agradecimentos e financiadores: Agradecemos à Agropecuária Zafanelli Silveira pela disponibilidade das instalações, dos animais e pelo suporte durante a realização deste estudo.

Effect of early prepubertal gonadotrophic stimulation on andrological parameters and indicators of testicular perfusion in young Nelore bulls

Mateus Bernardy¹, Celso Gabriel Ritz¹, Lucas Nascimento Stresser¹, Vinicius Mateus Santana Neves Araujo¹, João Pedro Terra Prado Borges², Denis Vinicus Bonato², Marcelo Marcondes Seneda¹, Fábio Morotti¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Paranaense

E-mail: mateusbernardy.mb@gmail.com

Prepubertal gonadotropin surges are essential for sexual maturation, but early endocrine modulation in bovine males remains poorly understood, unlike its extensive use in females. This study evaluated the effect of gonadotrophic stimulation with GnRH and hCG during the prepubertal period on andrological parameters and Doppler velocimetric indices of the suprastesticular artery in young bulls. The study included 44 contemporary Nelore calves, raised with their dams until weaning under semi-intensive conditions. At 3mo of age (90±15 days), using body weight and sire for blocking, they were distributed into 3 groups: Control (0.9% NaCl; i.m.; n=15), GnRH (300 µg gonadorelin; i.m.; Ovalyse®, Zoetis, Brazil; n=15), and hCG (1500 IU; i.m.; Vetcor®, Ceva, Brazil; n=14). The treatment was repeated 7 days later, and the calves remained with their dams until weaning (8 mo). Subsequently, the young bulls were kept on *Urochloa brizantha* cv. MG-5 pasture, with *ad libitum* water and mineral salt, without additional supplementation. Body weight and scrotal perimeter (SP) were measured every 2 mo (from 3 to 18 mo). At 12, 14, 16, and 18 mo, testicular volume (TV) measurements, evaluation of Doppler velocimetric indices of the suprastesticular artery [mean velocity (MV cm/s), resistive index (RI), and pulsatility index (PI) - Sonoscape S8®, Brazil], and semen collection via electroejaculation (Autojac3®, Neovet, Brazil) were performed for sperm kinematics analysis (AndroScope®, Minitube, Germany). Continuous longitudinal variables were analyzed using linear mixed models in R, considering the effects of treatment, time, and their interaction (Tukey's post-hoc and slicing), and pubertal dynamics by survival analysis (Kaplan-Meier) and Fisher's exact test (P<0.05). There was an effect of age (P<0.0001) on body weight and SP. Body weight increased from 114±7 kg (3 mo) to 409±7 kg (18 mo), with no treatment (P=0.81) or interaction (P=0.34) effects. SP showed a similar pattern, increasing from 13.9±0.6 cm (3 mo) and 20.3±0.6 cm (12 mo) to 29.9±0.6 cm (18 mo), with no treatment (P=0.17) or interaction (P=0.42) effects. At 16 mo, however, the hCG group presented a larger SP (28.0±0.6 cm) than the GnRH (25.9±0.6 cm) and Control (26.1±0.6 cm) groups. TV was influenced by age (P<0.0001), with no treatment (P=0.36) or interaction (P=0.56) effects. MV increased progressively (P<0.0001) from 12 mo until the onset of puberty in all groups. Furthermore, an interaction (treatment*time) was observed (P=0.05), revealing that at 16 mo, MV was higher in the GnRH (13.30±0.64) and hCG (13.20±0.61) groups compared to the Control (11.50±0.64). There was no effect of treatment (P=0.35) or interaction (P=0.84) on RI, but there was an effect of time (P=0.02), with means peaking at 14 mo (0.63±0.01) and showing a significant reduction at 16 mo (0.57±0.01) in all groups. PI also decreased with advancing age (P=0.01) in all groups. However, there was a trend for a treatment effect (P=0.07), evidenced by the maintenance of a higher PI (P<0.05) in the hCG group (0.79±0.06 and 0.74±0.06) compared to the Control (0.58±0.06 and 0.55±0.05) at 14 and 18 mo, respectively. Total and progressive motilities were not affected by treatment or interaction (P>0.10), only by age (P<0.0001). Total motility increased from 14.3% (14 mo) to 58.0% (18 mo), and progressive motility from 6.6% to 48.7%. At 12 mo, evaluable semen production occurred only in the hCG group. At 16 mo, the hCG group reached 100% puberty (14/14), which was higher than the Control (53.3%; 8/15; P=0.006), but did not differ from the GnRH group (80%; 12/15). In conclusion, most variables were influenced by age, as expected. Testicular perfusion indicators fluctuated in accordance with pubertal dynamics, proving to be reliable markers of puberty. Treatment with hCG was promising, resulting in greater SP, TV, and VM of the suprastesticular artery at 16 mo, in addition to advancing puberty compared to the control group.

Keywords: puberty induction, precocity, bull, spectral doppler, sperm kinematics.

Legal authorizations: CEUA/UDEL: 222022; 86057-970

Acknowledgments and funders: We thank Agropecuária Zafaneli Silveira for the availability of the facilities, the animals, and for the support during the execution of this study.

Efeito do Índice de Temperatura e Umidade sobre o Aproveitamento de Ejaculados em Touros de Diferentes Grupos Genéticos – Resultados preliminares

Thainá Sallum Bacco Manssur¹, André Maciel Crespilho², João Carlos Pinheiro Ferreira³

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ²Central Bela Vista, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
E-mail: thaina.bacco@unesp.br

A qualidade espermática em bovinos é fortemente influenciada por variações bioclimatológicas, tornando o monitoramento ambiental essencial para reduzir perdas reprodutivas e econômicas, especialmente no contexto das mudanças climáticas. Em centrais de sêmen, o uso contínuo do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) tem se tornado cada vez mais relevante para identificar períodos de estresse térmico e possíveis perdas de ejaculados destinados à congelamento. Este trabalho avaliou o efeito do ITU prévio à coleta sobre o aproveitamento de ejaculados de touros destinados à congelamento, alojados na Central Bela Vista (Botucatu, SP, Brasil), entre dezembro de 2025 e março de 2026. As amostras foram coletadas por meio de vagina artificial, sendo avaliados 305, 309, 271 e 285 reprodutores nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março, respectivamente. Os touros foram classificados, de acordo com sua origem genética, em três grupos: cruzados (*Bos indicus* × *Bos taurus*), *Bos taurus* e *Bos indicus*. O número de animais em cada grupo, nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março, respectivamente, foi de 23, 27, 26 e 31 para os cruzados; 37, 33, 27 e 37 para *Bos taurus*; e 245, 249, 218 e 217 para *Bos indicus*. Ao todo, foram coletados 1934, 2669, 2647 e 2678 ejaculados nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março, respectivamente. Desses, 1512, 2095, 2107 e 2062 ejaculados foram provenientes de *Bos indicus*; 268, 325, 295 e 371 de *Bos taurus*; e 154, 249, 245 e 245 de animais cruzados, respectivamente, ao longo dos mesmos meses. Foram considerados aprovados para congelamento aqueles ejaculados com motilidade $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 e defeitos totais $\leq 30\%$, sendo o aproveitamento definido como a porcentagem de ejaculados que atenderam a esses critérios em relação ao total coletado no período. Dados de temperatura ambiente e umidade relativa foram obtidos do INMET e utilizados para calcular o ITU médio 30 e 15 dias antes de cada coleta, representando fases associadas à meiose e à espermiogênese final, respectivamente. Os valores médios de ITU foram: 30 dias anteriores: nov/2025: 71,1; dez/2025: 75; jan/2026: 74,1; fev/2026: 73,6 e 15 dias anteriores: nov/2025: 71,2; dez/2025: 76,1; jan/2026: 72; mar/2026: 72,1. Por se tratar de dados de rotina de uma central comercial, nem todos os touros coletados ao longo dos diferentes meses correspondem aos mesmos indivíduos, uma vez que houve variação nos contratos durante o período. Ainda assim, o elevado número de animais avaliados confere robustez às estimativas de porcentagem de aproveitamento e à análise de sua relação com o ITU. O aproveitamento foi tratado como uma variável proporcional, definida como o percentual de ejaculados aprovados para congelamento, e correlacionado ao ITU por meio de análise de correlação de Pearson. Para todos os touros, o ITU médio de 30 dias antes da coleta não apresentou correlação significativa com o aproveitamento ($p > 0,05$), enquanto o ITU de 15 dias teve correlação negativa ($r = -0,96$; $p = 0,03$). Na análise por grupo genético, cruzados mostraram correlação negativa significativa com o ITU de 30 dias ($r = -0,99$; $p = 0,004$), sem significância para 15 dias ($p > 0,05$); já *Bos taurus* e *Bos indicus* não apresentaram correlações significativas em nenhum período avaliado. Conclui-se que o efeito do ITU sobre o aproveitamento de ejaculados depende do intervalo temporal considerado e do grupo genético, sendo mais evidente o impacto da exposição recente ao estresse térmico em determinadas combinações genéticas. Os resultados preliminares sugerem que condições ambientais adversas (alto ITU), durante as fases de meiose e etapas finais da espermiogênese, podem influenciar de forma crítica o desempenho reprodutivo de touros em centrais comerciais.

Palavras-chave: estresse térmico, criopreservação, espermatogênese, rendimento seminal, mudanças climáticas.

Autorizações legais: O estudo foi conduzido com dados de produção seminal de touros mantidos em regime de coleta seminal em uma central de inseminação artificial oficialmente registrada e em conformidade com a legislação

Agradecimentos e financiadores: À Central Bela Vista, pelo fornecimento dos dados e pelo suporte técnico. Este estudo foi financiado pela FAPESP (processo número 2020/15556-8) e CAPES (processo número 001)

Effect of Temperature–Humidity Index on Ejaculate Utilization in Bulls of Different Genetic Groups: Preliminary Results

Thainá Sallum Bacco Manssur¹, André Maciel Crespilho², João Carlos Pinheiro Ferreira³

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ²Central Bela Vista, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
 E-mail: thaina.bacco@unesp.br

Semen quality in bulls is strongly influenced by bioclimatic variations, making environmental monitoring essential to mitigate reproductive and economic losses, particularly in the context of climate change. In artificial insemination centers, continuous use of the Temperature–Humidity Index (THI) has become increasingly relevant to identify periods of heat stress and potential losses of ejaculates intended for cryopreservation. This study evaluated the effect of THI prior to semen collection on the utilization rate of ejaculates from bulls housed at Central Bela Vista (Botucatu, SP, Brazil) between December 2025 and March 2026. Samples were obtained using an artificial vagina, with 305, 309, 271, and 285 bulls evaluated in December, January, February, and March, respectively. Bulls were classified according to genetic background into three groups: crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*), *Bos taurus*, and *Bos indicus*. The number of animals per group in December, January, February, and March was 23, 27, 26, and 31 for crossbred; 37, 33, 27, and 37 for *Bos taurus*; and 245, 249, 218, and 217 for *Bos indicus*. A total of 1,934, 2,669, 2,647, and 2,678 ejaculates were collected in December, January, February, and March, respectively. Of these, 1,512, 2,095, 2,107, and 2,062 originated from *Bos indicus*; 268, 325, 295, and 371 from *Bos taurus*; and 154, 249, 245, and 245 from crossbred bulls, respectively. Ejaculates approved for cryopreservation were those with motility $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 , and total defects $\leq 30\%$; utilization rate was defined as the percentage of ejaculates meeting these criteria relative to the total collected during the period. Ambient temperature and relative humidity data were obtained from the Brazilian National Institute of Meteorology (INMET) and used to calculate the mean THI 30 and 15 days before each collection, corresponding to periods associated with meiosis and the final stages of spermiogenesis, respectively. The mean THI values were: 30 days prior – Nov/2025: 71.1; Dec/2025: 75; Jan/2026: 74.1; Feb/2026: 73.6; and 15 days prior – Nov/2025: 71.2; Dec/2025: 76.1; Jan/2026: 72; Mar/2026: 72.1. Since these were routine data from a commercial AI center, not all bulls collected over the different months were the same individuals, as contracts varied during the study period. Nevertheless, the large number of animals evaluated provides robustness to the utilization rate estimates and to the analysis of its relationship with THI. Utilization rate was treated as a proportional variable (percentage of ejaculates approved for cryopreservation) and correlated with THI using Pearson's correlation analysis. For all bulls combined, the mean THI 30 days prior to collection showed no significant correlation with utilization rate ($p > 0.05$), whereas the THI 15 days prior presented a negative correlation ($r = -0.96$; $p = 0.03$). When analyzed by genetic group, crossbred bulls exhibited a significant negative correlation with THI at 30 days ($r = -0.99$; $p = 0.004$), with no significance for the 15-day period ($p > 0.05$). *Bos taurus* and *Bos indicus* showed no significant correlations for either period. In conclusion, the effect of THI on the utilization rate of ejaculates depends on the time interval considered and the genetic group, with a more evident impact of recent exposure to heat stress in certain genetic combinations. Preliminary results suggest that adverse environmental conditions (high THI) during the phases of meiosis and final stages of spermiogenesis may critically influence the reproductive performance of bulls in commercial AI centers.

Keywords: heat stress, cryopreservation, spermatogenesis, semen yield, climate change.

Legal authorizations: The study was conducted using semen production data from bulls maintained under a semen collection program at an officially registered artificial insemination center, in compliance with Brazilian legi

Acknowledgments and funders: The authors thank the Central Bela Vista for providing the data and technical support. This study was supported by FAPESP (Grant #2020/15556-8) and CAPES (Grant # 001).

Efeito do status de capacitação espermática e do fluido folicular na regulação da adesão e desadesão em esferoides de oviduto bovino (EMEFOS)

Thawan Santana Piemonte¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Ana Beatriz Florencio da Silva², Viviane Beatriz Godoi Bacaro¹, Ricardo Itiki de Paschoal¹, Larissa Araújo Stábile¹, Marcilio Nichi¹, Marcella Pecora Milazzotto², Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade Federal do ABC
E-mail: piemontets@usp.br

A fecundação em mamíferos depende de uma interação entre gametas e ambiente do trato reprodutivo feminino. O oviduto constitui um microambiente especializado que favorece o transporte e o encontro dos gametas, além da formação do reservatório espermático, que mantém a viabilidade, a seleção de espermatozoides competentes e a regulação temporal da capacitação. À medida que a capacitação progride, os espermatozoides são liberados de forma controlada. Há evidências de que fatores presentes no fluido ovidutal desempenham papel central na modulação dessa dinâmica. Nesse sentido, estudos empregando modelos tridimensionais de esferoides mistos (EMEFOS) sugerem um efeito regulador específico sobre os mecanismos de desadesão. A hipótese deste estudo é que espermatozoides com capacitação prematura, possuem dificuldade para se soltar dos EMEFOS quando da suplementação com fluido folicular. O objetivo foi quantificar a adesão de espermatozoides aos EMEFOS, na presença ou ausência de agentes capacitantes, bem como o uso do fluido folicular de folículos pré-ovulatórios na desadesão espermática. Para a obtenção dos EMEFOS, células epiteliais e estromais do oviduto bovino foram coletadas, as células isoladas da região da ampola, criopreservadas e posteriormente cultivadas em monocamada para expansão, em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. Moldes de agarose a 1,5% foram preparados em placas de cultura. Após a expansão celular, as células epiteliais e estromais foram tripsinizadas, contadas e misturadas na proporção 7:3, com adição de matriz extracelular. A suspensão celular foi distribuída nos poços dos moldes de agarose e incubada a 38,5 °C. Após 24 horas, os esferoides formados foram removidos e transferidos para placas de 96 poços repelentes. Como delineamento experimental, 100.000 espermatozoides em 4 µL foram co-incubados com EMEFOS, em meio TL-STOCK com BSA – FAF em condições com ou sem agentes capacitantes, (heparina e PHE). Após 6 horas de incubação, a adesão espermática foi inferida pela subtração do total de células no início e pela concentração espermática final não aderida ao modelo. Em seguida, os esferoides foram incubados por 1 hora em meio suplementado com fluido folicular de folículos pré-ovulatórios, sendo preconizada a mesma análise, além da quantificação de espermatozoides remanescentes ligados a EMEFO pela coloração com Hoechst 33342 e visualizados sob microscopia de fluorescência. O status da capacitação espermática foi avaliado após os períodos de incubação pelo ensaio de clorotetraciclina (CTC), sendo os espermatozoides classificados em não capacitado (CTC 1), capacitado (CTC 2) e reagido (reação acrossomal já ocorreu; CTC 3). Os dados foram analisados por meio do teste t de Student, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nas gotas de meio com agente capacitante houve uma tendência a um menor número de espermatozoides soltos na gota em comparação aos sem agentes capacitantes ($47.187,5 \pm 6.587,9$ vs. $64.375,0 \pm 7.466,4$; $p = 0,06$), inferindo uma maior adesão de células aos EMEFOS, quando da presença desses agentes. Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de espermatozoides que se soltaram dos esferoides, na presença ou não do fluido folicular. Embora não significativo, os espermatozoides incubados previamente com agentes capacitantes, na ausência de fluido folicular, apresentaram duas vezes maior desadesão do que os incubados na presença de fluido. Por outro lado, no grupo sem agentes capacitantes, o comportamento foi inverso, o dobro dos espermatozoides permaneceu aderido aos EMEFOS, na ausência do FF. Como conclusão, a presença de agentes capacitantes parece ajudar na formação do reservatório espermático. A presença do fluido folicular não foi efetiva em promover a desadesão espermática, podendo ter sido influenciada por uma reação acrossômica precoce. Tal hipótese deve ser investigada em estudos com maior tamanho amostral.

Palavras-chave: Interação espermatozoide-epitélio, Modelo 3D, Microambiente ovidutal, Reservatório espermático

Autorizações legais: Não se aplica

Agradecimentos e financiadores: À FAPESP (processos nº 2024/19938-3, 2021/11747-6) e à CAPES pelo financiamento.

Effect of sperm capacitation status and follicular fluid on adhesion and detachment in bovine oviduct spheroids (EMEFOS)

Thawan Santana Piemonte¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Ana Beatriz Florencio da Silva², Viviane Beatriz Godoi Bacaro¹, Ricardo Itiki de Paschoal¹, Larissa Araújo Stábile¹, Marcilio Nichi¹, Marcella Pecora Milazzotto², Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade Federal do ABC
 E-mail: piemontets@usp.br

Mammalian fertilization relies on a coordinated interaction between gametes and the female reproductive tract environment. The oviduct constitutes a specialized microenvironment that supports gametes' transport and encounter, as well as the formation of the sperm reservoir, which maintains sperm viability, selects functionally competent cells, and regulates the timing of capacitation. As capacitation progresses, spermatozoa are released in a controlled manner. Evidence suggests that factors present in the oviductal fluid play a central role in modulating this dynamic. In this context, studies employing three-dimensional mixed spheroid models (EMEFOS) indicate a specific regulatory effect on sperm detachment mechanisms. The hypothesis of this study was that prematurely capacitated spermatozoa exhibit reduced ability to detach from EMEFOS upon exposure to follicular fluid. The objective was to quantify sperm adhesion to EMEFOS in the presence or absence of capacitating agents, as well as to evaluate the effect of pre-ovulatory follicular fluid on sperm detachment. For EMEFO production, bovine oviductal epithelial and stromal cells were collected, isolated from the ampullary region, cryopreserved, and subsequently cultured in a monolayer for expansion in medium supplemented with fetal calf serum and antibiotics. Agarose molds (1.5%) were prepared in culture plates. Following cell expansion, epithelial and stromal cells were trypsinized, counted, and combined at a 7:3 ratio, with the addition of extracellular matrix. The cell suspension was distributed into agarose molds and incubated at 38.5 °C. After 24 hours, the formed spheroids were removed and transferred to ultra-low attachment 96-well plates. For the experimental design, 100,000 spermatozoa in 4 µL were co-incubated with EMEFOS in TL-STOCK medium supplemented with fatty acid-free BSA, under conditions with or without capacitating agents (heparin and PHE). After 6 hours of incubation, sperm adhesion was inferred by subtracting the initial sperm count from the concentration of non-adhered cells in the medium. Subsequently, spheroids were incubated for 1 hour in medium supplemented with follicular fluid from pre-ovulatory follicles. The same analysis was performed, along with quantification of spermatozoa remaining bound to EMEFOS using Hoechst 33342 staining and fluorescence microscopy. Sperm capacitation status was assessed after incubation using the chlortetracycline (CTC) assay, with sperm classified as non-capacitated (CTC 1), capacitated (CTC 2), or acrosome-reacted (CTC 3). Data was analyzed using Student's t-test, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). In droplets containing capacitating agents, a trend toward a lower number of free spermatozoa was observed compared to those without capacitating agents ($47,187.5 \pm 6,587.9$ vs. $64,375.0 \pm 7,466.4$; $p = 0.06$), indicating increased adhesion to EMEFOS under these conditions. No significant differences were observed in the number of spermatozoa detached from spheroids in the presence or absence of follicular fluid. Although not statistically significant, spermatozoa previously incubated with capacitating agents, in the absence of follicular fluid, showed a twofold higher detachment compared to those incubated in the presence of follicular fluid. Conversely, in the group without capacitating agents, the pattern was reversed, with twice as many spermatozoa remaining attached to the oviductal epithelial spheroids (EMEFOS) in the absence of follicular fluid. In conclusion, the presence of capacitating agents appears to facilitate the formation of the sperm reservoir. Follicular fluid was not effective in promoting sperm detachment, which may have been influenced by a premature acrosome reaction. This hypothesis should be further investigated in studies with a larger sample size.

Keywords: 3D Model, Oviductal microenvironment, Sperm reservoir, Sperm-epithelium interaction

Legal authorizations: It does not apply

Acknowledgments and funders: FAPESP (grant numbers 2024/19938-3, 2021/11747-6) and CAPES for funding.

Efeitos da administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre a antecipação da puberdade em machos bovinos da raça Nelore

Neimar Corrêa Severo¹, Larissa Nunes Oliveira², Patricia Carolina Ferreira Wainer³, Ricardo Araújo Micaí², Manoel Lucas Carvalho da Silva¹, Leonardo Teixeira⁴, Renata Lançoni⁵

¹NCSevero Serviços Ltda., ²ABS, ³Androplus, ⁴Sincroniza Gerenciamento Pecuário, ⁵Universidade Federal de Uberlândia
E-mail: ncsevero@gmail.com

Os andrógenos são importantes para o desenvolvimento sexual nos machos, para a saúde reprodutiva e para a homeostase metabólica. A maturidade sexual precoce impacta positivamente a rentabilidade dos rebanhos, reduzindo custos e aumentando a eficiência reprodutiva. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem ação análoga ao hormônio luteinizante (LH) estimulando a produção de testosterona pelas células de Leydig nos testículos atuando no processo de espermatogênese. O objetivo desse estudo foi verificar a ação da hCG na produção de sêmen e no desenvolvimento sexual em machos da raça Nelore pré-púberes, com o propósito de antecipar a entrada na reprodução. Vinte touros da raça Nelore pré-púberes com idades entre 11 a 12 meses foram divididos em dois grupos de 10 animais: Grupo 1 (controle) e Grupo 2 (tratados com 2500 UI de hCG intramuscular a cada 7 dias por 35 dias). Todos os animais passaram por avaliações clínicas mensais durante 90 dias após a 1ª aplicação de hCG incluindo aferições de peso e perímetro escrotal, além da colheita de sêmen para análise subjetiva de motilidade (0 a 100%) e vigor (0 a 5) em microscopia óptica, concentração (espermatozoides/mL) avaliada em câmara de Neubauer morfologia espermática (microscopia de contraste de fase em 1000 aumentos). O sêmen foi colhido por eletroejaculação e foram realizadas análises de suas características físicas e morfológicas. Foi ajustado um modelo linear generalizado misto com distribuição binomial e função de ligação logit para avaliar o efeito do tratamento com hCG, da data e da interação tratamento x data sobre a probabilidade de puberdade, considerando o touro como efeito aleatório. Não foi observado efeito significativo do tratamento com hCG sobre a puberdade ($p = 0,1008$), nem da interação tratamento x data ($p = 0,6233$). O efeito de data apresentou tendência à significância ($p = 0,0821$), com aumento da probabilidade de puberdade nas avaliações tardias, sugerindo progressão temporal da puberdade independentemente do tratamento. Foi ajustado um modelo misto para medidas repetidas a fim de avaliar os efeitos do tratamento com hCG, da data e da interação tratamento x data sobre o peso corporal, perímetro escrotal dos touros, variáveis de qualidade seminal, considerando o animal como unidade experimental. Para peso e perímetro, não foi observado efeito significativo do tratamento com hCG (peso: $p = 0,6334$; perímetro escrotal: $p = 0,7118$), nem da interação tratamento x data (peso: $p = 0,1221$; perímetro escrotal: $p = 0,1865$). Em contrapartida, houve efeito significativo de data para peso e perímetro escrotal ($p < 0,0001$), com aumento progressivo das médias ajustadas ao longo das avaliações, indicando que as alterações observadas refletiram principalmente o crescimento dos animais durante o período experimental, independentemente do tratamento. Não foi observado efeito significativo do tratamento com hCG sobre motilidade ($p = 0,8557$), vigor ($p = 0,7729$), concentração espermática ($p = 0,5212$), defeitos maiores ($p = 0,7580$) ou defeitos totais ($p = 0,6594$). Também não houve efeito significativo da interação tratamento x data para essas variáveis ($p > 0,05$). Houve efeito de data apenas para defeitos maiores ($p = 0,0432$) e defeitos totais ($p = 0,0486$), indicando variação temporal independente do tratamento. Para defeitos menores, observou-se efeito significativo do tratamento ($p = 0,0191$), da data ($p = 0,0042$) e da interação tratamento x data ($p = 0,0096$), evidenciando que o comportamento dessa variável diferiu entre os grupos ao longo das avaliações. Portanto, conclui-se que a aplicação de hCG a cada 7 dias durante 35 dias não foi eficiente para antecipar a puberdade de tourinhos pré-púberes, provavelmente pelo fato da metodologia das aplicações não mimetizarem os estímulos hormonais fisiológico dos machos.

Palavras-chave: reprodução, touros, hormônios, sêmen, precocidade

Autorizações legais: protocolo nº 23117.077584/2025-66, CEUA/UFU, UBERLÂNDIA, MG, CEP 38400-902

Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) administration on the anticipation of puberty in male Nelore cattle

Neimar Corrêa Severo¹, Larissa Nunes Oliveira², Patricia Carolina Ferreira Wainer³, Ricardo Araújo Micai², Manoel Lucas Carvalho da Silva¹, Leonardo Teixeira⁴, Renata Lançoni⁵

¹NCSevero Serviços Ltda., ²ABS, ³Androplus, ⁴Sincroniza Gerenciamento Pecuário, ⁵Universidade Federal de Uberlândia
E-mail: ncsevero@gmail.com

Androgens are important for sexual development in males, for reproductive health, and for metabolic homeostasis. Early sexual maturity positively impacts herd profitability, reducing costs and increasing reproductive efficiency. Human chorionic gonadotropin (hCG) has an action analogous to luteinizing hormone (LH), stimulating testosterone production by Leydig cells in the testes, acting in the spermatogenesis process. The objective of this study was to verify the action of hCG on semen production and sexual development in pre-pubertal Nelore bull calves, with the purpose of anticipating the onset of reproduction. Twenty pre-pubertal Nelore bulls aged 11 to 12 months were divided into two groups of 10 animals: Group 1 (control) and Group 2 (treated with 2500 IU of hCG intramuscularly every 7 days for 35 days). All animals underwent monthly clinical evaluations for 90 days after the first hCG application, including weight and scrotal circumference measurements, as well as semen collection for subjective analysis of motility (0 to 100%) and vigor (0 to 5) using optical microscopy, concentration (sperm/mL) evaluated in a Neubauer chamber, and sperm morphology (phase contrast microscopy at 1000x magnification). Semen was collected by electroejaculation, and analyses of its physical and morphological characteristics were performed. A generalized linear mixed model with a binomial distribution and logit link function was fitted to evaluate the effect of hCG treatment, date, and treatment x date interaction on the probability of puberty, considering the bull as a random effect. No significant effect of hCG treatment on puberty was observed ($p = 0.1008$), nor of the treatment x date interaction ($p = 0.6233$). The date effect showed a trend towards significance ($p = 0.0821$), with an increased probability of puberty in late evaluations, suggesting temporal progression of puberty independent of treatment. A mixed model for repeated measures was fitted to evaluate the effects of hCG treatment, date, and treatment x date interaction on body weight, scrotal circumference of bulls, and semen quality variables, considering the animal as the experimental unit. For weight and circumference, no significant effect of hCG treatment was observed (weight: $p = 0.6334$; scrotal circumference: $p = 0.7118$), nor of the treatment x date interaction (weight: $p = 0.1221$; scrotal circumference: $p = 0.1865$). In contrast, there was a significant date effect for weight and scrotal circumference ($p < 0.0001$), with a progressive increase in adjusted means throughout the evaluations, indicating that the observed changes mainly reflected the animals' growth during the experimental period, regardless of the treatment. No significant effect of hCG treatment was observed on motility ($p = 0.8557$), vigor ($p = 0.7729$), sperm concentration ($p = 0.5212$), major defects ($p = 0.7580$), or total defects ($p = 0.6594$). There was also no significant effect of the treatment x date interaction for these variables ($p > 0.05$). There was a date effect only for major defects ($p = 0.0432$) and total defects ($p = 0.0486$), indicating temporal variation independent of treatment. For minor defects, a significant effect of treatment ($p = 0.0191$), date ($p = 0.0042$), and the treatment x date interaction ($p = 0.0096$) was observed, showing that the behavior of this variable differed between groups throughout the evaluations. Therefore, it is concluded that the application of hCG every 7 days for 35 days was not efficient in anticipating puberty in pre-pubertal bull calves, probably because the application methodology did not mimic the physiological hormonal stimuli of males.

Keywords: reproduction, bulls, hormones, semen, precocity

Legal authorizations: protocolo nº 23117.077584/2025-66, CEUA/UFU, UBERLÂNDIA, MG, CEP 38400-902

Eficiência comparativa de dois sistemas automatizados de criopreservação do sêmen bovino

Luís Eduardo César da Rocha Campos¹, Luis Felipe Canela de Souza², Marcelo Sant'Ana Borges³, Micael Sanches Carrilho², Natasha Silva Gonçalves², Renan Silva Gomes², Fabíola Aparecida Afonso², André Maciel Crespilha^{2,4}

¹Minitube do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil, ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil, ³Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho, SP, Brasil, ⁴Vetsemen, Análise de Sêmen para Inseminação Artificial, Barueri, SP, Brasil
E-mail: lecampos@minitube.com.br

O mercado da inseminação artificial (IA) no Brasil vivencia momento de recorde histórico e franca expansão, com crescimento no número de doses de sêmen produzidas na ordem de 12% e balanço consolidado para o ano de 2025 superior a 23 milhões de doses. Parte do crescimento de mercado pode ser atribuído à tecnificação dos criatórios e implementação de programas reprodutivos cada vez mais eficientes, como também aos investimentos massivos em processos, treinamento e equipamentos que vêm sendo implementados nas Centrais de Inseminação Artificial (CIA). Nesse contexto, estudos anteriores demonstraram que os equipamentos voltados à criopreservação espermática podem influenciar não apenas na qualidade do sêmen pós-descongelamento, como também na taxa de concepção de fêmeas submetidas à IA. Dessa forma, o objetivo do estudo foi a avaliação comparativa dos dois principais equipamentos desenvolvidos para criopreservação do sêmen bovino em escala industrial. Para o estudo, foram selecionadas as congeladoras de sêmen modelo TurboFreezer® (Minitube, Tiefenbach, Alemanha), que se baseia na aplicação de fluxo horizontal e unidirecional de vapor de nitrogênio líquido que permite homogênea distribuição de temperatura dentro da câmara de congelamento; e o sistema Digitcool® (IMV Technologies, L'Aigle, França), baseado em entrada única de ar na câmara de congelamento, com circulação de temperatura através de ventilador mecânico. Para o estudo foram selecionados ejaculados de 53 touros de diferentes raças e idades (3 a 8 anos). Após a coleta, cada ejaculado foi diluído em meio Optidyl® (IMV Technologies, L'Aigle, França) de forma a estabelecer concentração média de 100×10^6 espermatozoides/ml. As amostras diluídas foram transferidas para câmara fria estabilizada a temperatura constante de 40°C, sendo envasadas em palhetas de 0,25 ml, acondicionadas em rampas metálicas destinadas à congelamento do sêmen. Todas as amostras permaneceram à temperatura constante de 40°C por período de até 24 horas (overnight) durante a fase de equilíbrio. Após a etapa de refrigeração as doses de sêmen foram igualmente divididas e transferidas para uma das congeladoras em teste. As palhetas de cada reprodutor foram alocadas na mesma posição (topo, centro ou fundo) em cada equipamento. Da mesma forma, as congeladoras foram programadas para realização de curva de congelamento similar: 1a fase de 40°C (temperatura de equilíbrio) até -10°C (redução de 5 °C/min); 2a fase de -10 °C até -100 °C (40°C/min); e 3a fase de -100 °C até -140 °C (20°C/min). Após a criopreservação as amostras foram acondicionadas em botijões criobiológicos para posterior avaliação cinética em sistema CASA-IVOS II (Hamilton Thorne, USA), onde foram consideradas as variáveis motilidade total e progressiva (principais parâmetros observados pelas CIA para liberação das doses ao mercado). Os dados gerados foram avaliados através de PROC-MIXED® (SAS), considerando o efeito principal dos sistemas de congelamento sobre as variáveis de movimento espermático. As motilidades espermáticas total e progressiva pós-criopreservação foram de $53,20 \pm 9,58\%$ e $56,13 \pm 9,52\%$ ($P=0,0029$), e de $42,7 \pm 9,15\%$ e $44,64 \pm 9,76\%$ ($P=0,0621$), respectivamente para os sistemas Digitcool e TurboFreezer. Quando considerados apenas os touros com os piores resultados de movimento pós-descongelamento (quartil inferior), a motilidade espermática total foi de $41,22 \pm 4,13\%$ e $47,31 \pm 7,31\%$ ($P=0,0111$) e a progressiva foi de $33,5 \pm 4,94\%$ e $37,66 \pm 9,31\%$ ($P=0,0639$), respectivamente para os sistemas Digitcool e TurboFreezer. Conclui-se que o equipamento TurboFreezer apresenta melhor desempenho para criopreservação do sêmen bovino, resultando em maior preservação das características cinéticas pós-descongelamento. Provavelmente, o melhor desempenho do equipamento pode ser atribuído à distribuição uniforme de temperatura durante o processamento do sêmen, garantindo maior homogeneidade do processo de criopreservação.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, bovino, congeladoras, reprodução bovina.

Autorizações legais: O presente estudo não envolveu procedimentos experimentais invasivos ou que implicassem em manipulação que demandasse aprovação por Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Agradecimentos e financiadores: Aos colaboradores envolvidos na execução experimental e análise dos dados.

Comparative efficiency of two automated systems for bovine semen cryopreservation

Luís Eduardo César da Rocha Campos¹, Luis Felipe Canela de Souza², Marcelo Sant'Ana Borges³, Micael Sanches Carrilho², Natasha Silva Gonçalves², Renan Silva Gomes², Fabíola Aparecida Afonso², André Maciel Crespillo^{2,4}

¹Minitube do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil, ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil, ³Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho, SP, Brasil, ⁴Vetsemen, Análise de Sêmen para Inseminação Artificial, Barueri, SP, Brasil
 E-mail: lecampos@minitube.com.br

The artificial insemination (AI) market in Brazil is experiencing a period of historic records and robust expansion, with growth in the number of semen doses produced at a rate of 12% and a consolidated balance for 2025 exceeding 23 million doses. Part of this market growth can be attributed to the technification of breeding farms and the implementation of increasingly efficient reproductive programs, as well as massive investments in processes, training, and equipment within Artificial Insemination Centers (AIC). In this context, previous studies have shown that equipment dedicated to sperm cryopreservation can influence not only post-thaw semen quality but also the conception rates of females submitted to AI. Therefore, the objective of this study was the comparative evaluation of the two primary systems developed for industrial-scale bovine semen cryopreservation. For the study, TurboFreezer® (Minitube, Tiefenbach, Germany) semen freezers were selected, which rely on the application of horizontal and unidirectional liquid nitrogen vapor flow, allowing for a homogeneous temperature distribution within the freezing chamber; and the Digitcool® system (IMV Technologies, L'Aigle, France), based on a single air inlet in the freezing chamber with temperature circulation via a mechanical fan. Ejaculates from 53 bulls of different breeds and ages (3 to 8 years) were selected for the study. After collection, each ejaculate was diluted in Optidyl® medium (IMV Technologies, L'Aigle, France) to establish an average concentration of 100x10⁶ spermatozoa/ml. Diluted samples were transferred to a cold room stabilized at a constant temperature of 4°C, packaged in 0.25 mL straws, and placed on metal ramps for semen freezing. All samples remained at a constant temperature of 4°C for up to 24 hours (overnight) during the equilibration phase. Following the refrigeration stage, the semen doses were equally divided and transferred to one of the freezers under testing. The straws from each sire were placed in the same position (top, center, or bottom) in each equipment. Likewise, the freezers were programmed with a similar freezing curve: 1st phase from 4°C (equilibration temperature) to -10°C (5°C/min reduction); 2nd phase from -10°C to -100°C (40°C/min); and 3rd phase from -100°C to -140°C (20°C/min). After cryopreservation, samples were stored in cryogenic tanks for subsequent kinetic evaluation using the CASA-IVOS II system (Hamilton Thorne, USA), considering total and progressive motility (the main parameters observed by AICs for releasing doses to the market). The generated data were evaluated using PROC-MIXED® (SAS), considering the main effect of the freezing systems on sperm movement variables. Total and progressive post-cryopreservation sperm motilities were 53.20 ± 9.58% and 56.13 ± 9.52% (P=0.0029), and 42.7 ± 9.15% and 44.64 ± 9.76% (P=0.0621), respectively, for the Digitcool and TurboFreezer systems. When considering only the bulls with the poorest post-thaw movement results (lower quartile), total sperm motility was 41.22 ± 4.13% and 47.31 ± 7.31% (P=0.0111), and progressive motility was 33.5 ± 4.94% and 37.66 ± 9.31% (P=0.0639), respectively, for the Digitcool and TurboFreezer systems. It is concluded that TurboFreezer equipment presents better performance for bovine semen cryopreservation, resulting in higher preservation of post-thaw kinetic characteristics. Probably, the better performance of the equipment can be attributed to the uniform temperature distribution during semen processing, ensuring greater homogeneity in the cryopreservation process.

Keywords: cryopreservation, semen, bovine, freezers, bovine reproduction.

Legal authorizations: This study did not involve invasive experimental procedures or manipulations requiring approval by an Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA).

Acknowledgments and funders: To the collaborators involved in the experimental execution and data analysis.

Ejaculados de cores amarelo citrino apresentam influência na qualidade espermática?

Rubens Paes de Arruda¹, Alexandre Rossetto Garcia^{2,3}, Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Alessandra Regina Carrer⁴, Bruna Eduarda Moreira Feio Falcão³, Joedson Dantas Gonçalves^{2,3}, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Universidade Federal do Pará,

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

E-mail: arrudarp@usp.br

A avaliação dos aspectos do sêmen é muito importante. Podemos observar ejaculados de cores: avermelhado (sangue), acinzentado (sujidades) ou amarelado (urina ou piócitos). Muitas vezes andrologistas menos experientes observam ejaculados de cor amarelada (amarelo citrino) e ficam em dúvida sobre a influência desta coloração na qualidade espermática. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da coloração do sêmen sobre as características espermáticas em machos jovens das raças Nelore (Nel) e Canchim (Can). Foram avaliados por doze meses 46 machos jovens das raças Nelore (n=22) e Canchim (n=24), com 17,7 ± 0,2 meses de idade. Os animais foram mantidos em pastejo rotacionado intensivo (*Urochloa brizantha*). O sêmen foi colhido mensalmente por eletroejaculação e, sendo observado no microscópio a presença de células espermáticas, os ejaculados foram classificados como de cor branca (BC) ou amarelo citrino (AC). As amostras de sêmen *in natura* foram avaliadas quanto ao pH, motilidade total e progressiva pelo CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), concentração espermática e características morfológicas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A estatística foi realizada por meio de análises de variância (ANOVA) seguindo um delineamento fatorial 2x2 (raça x cor do ejaculado), utilizando o *software* RStudio. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). De 142 ejaculados estudados, foram observados: 38,73% brancos e 61,26% amarelo citrino, sendo Nelore (n=47; 46,81% BC vs. 53,19% AC) e Canchim (n=95; 34,74% BC vs. 65,26% AC). Não houve diferença entre o pH dos ejaculados (P = 0.251; Nel_BC: 7,3 ± 0,1; Nel_AC: 7,3 ± 0,1; Can_BC: 7,6 ± 0,1; Can_AC: 7,4 ± 0,1). Também não houve diferença na cinética espermática, motilidade total (P = 0.643; Nel_BC: 79,5 ± 3,7; Nel_AC: 76,2 ± 3,9; Can_BC: 77,7 ± 2,9; Can_AC: 77,9 ± 3,0%) e motilidade progressiva (P = 0.274; Nel_BC: 66,0 ± 3,1; Nel_AC: 60,9 ± 3,3; Can_BC: 60,7 ± 2,5; Can_AC: 61,2 ± 2,5%). Entretanto, houve interação para concentração espermática (P < 0.001; Nel_BC: 406,8a ± 90,5; Nel_AC: 151,9b ± 29,0; Can_BC: 425,0a ± 65,3; Can_AC: 156,7b ± 25,9 10⁶ spz/mL) e para os defeitos espermáticos totais (P = 0.001; Nel_BC: 48,0ab ± 4,8; Nel_AC: 56,9ab ± 5,9; Can_BC: 42,1b ± 3,8; Can_AC: 60,3^a ± 3,4%). Neste estudo, a cor do ejaculado branco ou amarelo citrino não influenciou o pH ou a cinética espermática. Entretanto, independentemente da raça os ejaculados classificados como brancos apresentaram maior concentração espermática em comparação aos ejaculados classificados como amarelo citrino. A morfologia espermática não foi influenciada pela cor do ejaculado na raça Nelore. Entretanto, os touros jovens Canchim com ejaculado branco apresentaram menor quantidade de defeitos espermáticos quando comparados aos touros Nelore e Canchim com ejaculados de cor amarelo citrino. Algumas pesquisas citam que a cor amarelo citrino do ejaculado de machos bovinos, se deve à presença de riboflavina oriunda da alimentação dos animais. A alta incidência da cor amarelo citrino, neste estudo, pode ser devido a uma característica das pastagens onde os animais foram mantidos.

Palavras-chave: sêmen, machos bovinos, riboflavina, amarelo citrino.

Autorizações legais: Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brasil; Protocolo 20.22.00.137.00.00/2023)

Agradecimentos e financiadores: FAPESP (Processo 2021/04335-3), CAPES (Código de Financiamento 001).

Do ejaculates with a citrine yellow color influence sperm quality?

Rubens Paes de Arruda¹, Alexandre Rossetto Garcia^{2,3}, Giovanna Galhardo Ramos^{1,2}, Alessandra Regina Carrer⁴, Bruna Eduarda Moreira Feio Falcão³, Joedson Dantas Gonçalves^{2,3}, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Universidade Federal do Pará, ⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
 E-mail: arrudarp@usp.br

The evaluation of semen aspects is very important. We can observe ejaculates of the following colors: reddish (blood), grayish (impurities), or yellowish (urine or pyocytes). Often, less experienced andrologists observe ejaculates of a yellowish color (citrine yellow) and are unsure about the influence of this color on sperm quality. In this sense, the objective of this study was to evaluate the influence of semen color on sperm characteristics in young males of the Nelore (Nel) and Canchim (Can) breeds. Forty-six young males of the Nelore (n=22) and Canchim (n=24) breeds, aged 17.7 ± 0.2 months, were evaluated for twelve months. The animals were kept in intensive rotational grazing (*Urochloa brizantha*). Semen was collected monthly by electroejaculation and, after microscopic observation of the presence of sperm cells, ejaculates were classified as white (BC) or citrine yellow (AC). Fresh semen samples were evaluated for pH, total and progressive motility using CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), sperm concentration, and morphological characteristics using differential interference contrast (DIC) microscopy. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) following a 2x2 factorial design (race x ejaculate color) using RStudio software. Means were compared using Tukey's test ($P < 0.05$). Of the 142 ejaculates studied, the following were observed: 38.73% white and 61.26% citrine yellow, being Nelore (n=47; 46.81% BC vs. 53.19% AC) and Canchim (n=95; 34.74% BC vs. 65.26% AC). There was no difference between the pH of the ejaculates ($P = 0.251$; Nel_BC: 7.3 ± 0.1 ; Nel_AC: 7.3 ± 0.1 ; Can_BC: 7.6 ± 0.1 ; Can_AC: 7.4 ± 0.1). There was also no difference in sperm kinetics, total motility ($P = 0.643$; Nel_BC: 79.5 ± 3.7 ; Nel_AC: 76.2 ± 3.9 ; Can_BC: 77.7 ± 2.9 ; Can_AC: $77.9 \pm 3.0\%$) and progressive motility ($P = 0.274$; Nel_BC: 66.0 ± 3.1 ; Nel_AC: 60.9 ± 3.3 ; Can_BC: 60.7 ± 2.5 ; Can_AC: $61.2 \pm 2.5\%$). However, there was an interaction for sperm concentration ($P < 0.001$; Nel_BC: $406.8a \pm 90.5$; Nel_AC: $151.9b \pm 29.0$; Can_BC: $425.0a \pm 65.3$; Can_AC: $156.7b \pm 25.9$ 106 sperm/mL) and for total sperm defects ($P = 0.001$; Nel_BC: $48.0ab \pm 4.8$; Nel_AC: $56.9ab \pm 5.9$; Can_BC: $42.1b \pm 3.8$; Can_AC: $60.3a \pm 3.4\%$). In this study, the color of the ejaculate (white or citrine yellow) did not influence pH or sperm kinetics. However, regardless of breed, ejaculates classified as white showed a higher sperm concentration compared to ejaculates classified as citrine yellow. Sperm morphology was not influenced by ejaculate color in the Nelore breed. However, young Canchim bulls with white ejaculates showed a lower number of sperm defects when compared to Nelore and Canchim bulls with citrine yellow ejaculates. Some research suggests that the citrine yellow color of male bovine ejaculates is due to the presence of riboflavin from the animals' diet. The high incidence of citrine yellow color in this study may be due to a characteristic of the pastures where the animals were kept.

Keywords: semen, male bovine, riboflavin, citrine yellow.

Legal authorizations: Ethics Committee on the Use of Animals of Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brazil; Protocol 20.22.00.137.00.00/2023)

Acknowledgments and funders: FAPESP (Process 2021/04335-3), CAPES (Funding Code 001).

Fertilidade de touro com alto percentual de patologias espermáticas: relato de caso

Lívia Noemy Aires de Lucena¹, Juli Angélica Narváez Cancimans¹, Aldo Gimendis Pereira de Melo², Lúcia Cristina Pereira Arruda³, José Frederico Straggiotti Silva⁴, Gustavo de Oliveira Alves Pinto⁵, Gustavo Ferrer Carneiro⁵

¹Centro Universitário Facol, ²Autônomo, ³Autônoma, ⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco

E-mail: liviaaireslucena@gmail.com

A avaliação andrológica é uma ferramenta essencial na seleção de reprodutores bovinos, permitindo identificar animais com capacidade reprodutiva adequada, contribuindo para a eficiência dos sistemas de produção. Entre os parâmetros avaliados, a morfologia espermática é considerada um importante indicador de fertilidade, sendo estabelecidos limites de defeitos para aprovação de reprodutores. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo relatar o desempenho reprodutivo de um touro com elevado percentual de defeitos espermáticos maiores, mas que apresentou taxa de prenhez satisfatória em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Um touro da raça Sindi, sexualmente maduro e com bom histórico reprodutivo, foi coletado para criopreservação do sêmen. O ejaculado foi submetido a avaliação macro e microscópica, apresentando 85% de motilidade total e vigor = 4, atendendo aos critérios mínimos do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) para sêmen fresco de touros. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer. Para criopreservação, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado (Botusêmen®), centrifugado para remoção do plasma seminal e ressuspenso em diluidor comercial (Botubov®), ajustando-se a concentração final para 200×10^6 espermatozoides/mL. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas em sistema automatizado (TK 3000®), sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após o descongelamento (37 °C/30 s) de duas palhetas, foram realizadas análises de cinemática espermática por sistema computadorizado (CASA), integridade de membrana plasmática e avaliação de patologias espermáticas por coloração com eosina-nigrosina. Os resultados médios demonstraram motilidade total = 78,1%, motilidade progressiva = 55,6% e elevado percentual de células com membrana plasmática íntegra (60%). Entretanto, a avaliação morfológica revelou elevado percentual de defeitos, principalmente defeitos maiores, com destaque para cauda fortemente dobrada ou enrolada (30%), além de 4% de defeitos menores. De acordo com os critérios do CBRA, o sêmen bovino deve apresentar no máximo 10% de defeitos maiores e 30% de defeitos totais, o que classificaria a amostra como reprovada. Apesar disso, o sêmen foi utilizado em um protocolo de IATF em 26 vacas da raça Sindi. O diagnóstico gestacional foi realizado 35 dias após a inseminação por palpação retal e ultrassonografia. A taxa de prenhez obtida foi de 53,8%, valor compatível com a média nacional observada em programas de IATF (50–55%). Este resultado pode ser atribuído à excelente cinética espermática pós-descongelamento e à estratégia de alta concentração por dose, resultando em aproximadamente 39 milhões de espermatozoides móveis por palheta. Essa alta concentração de células viáveis pode ter compensado o percentual de patologias, permitindo que a população de 66% de espermatozoides morfológicamente normais competisse eficientemente no sítio de fertilização. Adicionalmente, defeitos de cauda (fortemente dobrada/enrolada) são frequentemente autolimitantes, impedindo que a célula progrida no trato reprodutivo feminino, o que pode atuar como uma seleção fisiológica que favorece a fertilização apenas por células funcionais. Conclui-se que, o elevado percentual de defeitos maiores detectados neste relato não comprometeu o desempenho reprodutivo do touro avaliado, que pode ter sido assegurado pela alta dose inseminante e boa motilidade pós-criopreservação. A principal alteração observada foi a presença de cauda fortemente dobrada ou enrolada, que não comprometeu a taxa de prenhez nas condições avaliadas. Esses resultados indicam que a predominância desse defeito pode ser compatível com fertilidade satisfatória quando outros parâmetros seminais permanecem adequados, embora estudos adicionais sejam necessários para investigar sua possível herdabilidade.

Palavras-chave: morfologia espermática, criopreservação, IATF.

Autorizações legais: não aplicável.

Fertility of a bull with a high percentage of sperm pathologies: a case report

Livia Noemy Aires de Lucena¹, Juli Angélica Narváez Cancimans¹, Aldo Gimendis Pereira de Melo², Lúcia Cristina Pereira Arruda³, José Frederico Straggiotti Silva⁴, Gustavo de Oliveira Alves Pinto⁵, Gustavo Ferrer Carneiro⁵

¹Centro Universitário Facol, ²Autônomo, ³Autônoma, ⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco

E-mail: liviaaireslucena@gmail.com

Andrological evaluation is an essential tool in the selection of bovine breeders, allowing the identification of animals with adequate reproductive capacity and contributing to the efficiency of production systems. Among the evaluated parameters, sperm morphology is considered an important indicator of fertility, with defect thresholds established for breeder approval. In this context, the present study aimed to report the reproductive performance of a bull with a high percentage of major sperm defects that nevertheless achieved a satisfactory pregnancy rate in a fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol. A sexually mature Sindi bull with a good reproductive history was collected for semen cryopreservation. The ejaculate was subjected to macroscopic and microscopic evaluation, showing 85% total motility and vigor = 4, meeting the minimum criteria established by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA) for fresh bull semen. Sperm concentration was determined by using a Neubauer chamber. For cryopreservation, the semen was diluted in a skim milk-based extender (Botusêmen®), centrifuged to remove seminal plasma, and resuspended in a commercial extender (Botubov®), adjusting the final concentration to 200×10^6 spermatozoa/mL. Samples were packaged in 0.25 mL straws and frozen in an automated system (TK 3000®), then stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 s) of two straws, sperm kinetics were analyzed using a computer-assisted system (CASA), along with plasma membrane integrity and sperm pathology assessment using eosin-nigrosin staining. Mean results showed total motility = 78.1%, progressive motility = 55.6%, and a high percentage of sperm with intact plasma membranes (60%). However, morphological evaluation revealed a high percentage of defects, mainly major defects, particularly strongly bent or coiled tails (30%), in addition to 4% minor defects. According to CBRA criteria, bovine semen should present a maximum of 10% major defects and 30% total defects, which would classify this sample as unsuitable. Despite this, the semen was used in an FTAI protocol in 26 Sindi cows. Pregnancy diagnosis was performed 35 days after insemination by rectal palpation and ultrasonography. The pregnancy rate obtained was 53.8%, consistent with the national average observed in FTAI programs (50–55%). This result may be attributed to excellent post-thaw sperm kinetics and the strategy of high concentration per dose, resulting in approximately 39 million motile sperm per straw. This high concentration of viable cells may have compensated for the percentage of abnormalities, allowing the population of 66% morphologically normal sperm to compete efficiently at the fertilization site. Additionally, tail defects (strongly bent/coiled) are often self-limiting, preventing the sperm cell from progressing through the female reproductive tract, which may act as a physiological selection mechanism favoring fertilization by functional cells only. It is concluded that the high percentage of major defects detected in this report did not compromise the reproductive performance of the evaluated bull, which may have been ensured by the high insemination dose and good post-cryopreservation motility. The main alteration observed was the presence of strongly bent or coiled tails, which did not impair pregnancy rate under the evaluated conditions. These results indicate that the predominance of this defect may be compatible with satisfactory fertility when other seminal parameters remain adequate, although further studies are needed to investigate its possible heritability.

Keywords: sperm morphology, cryopreservation, FTAI.

Legal authorizations: no applicable.

Formato testicular e a hemodinâmica da artéria supratesticular em touros Nelore

Celso Gabriel Ritz¹, Deborah Nakayama Yokomizo¹, Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Fábio Morotti¹, Julia Batistela Giusti¹, Gabriela Rodrigues de Paula¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Flavio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Norte do Paraná
E-mail: gabrielritz007@gmail.com

A utilização da biometria testicular permite avaliação do crescimento e verificação de alterações reprodutivas que impactam diretamente na qualidade seminal dos animais. Touros de origem zebuína possuem testículos com formato mais alongado quando comparados com animais de origem europeia. Testículos com formato mais alongado possuem maior área superficial o que permite melhor dissipação de calor. Para a adequada produção de espermatozoides é necessário que a temperatura do escroto esteja de 4 a 6°C abaixo da temperatura corporal, desta forma é importante uma eficiente termorregulação testicular, sendo formato do testículo um dos fatores que interferem na termorregulação testicular. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações na hemodinâmica testicular na artéria supratesticular considerando o formato testicular. O experimento foi conduzido em uma propriedade localizada no município de Londrina, PR, de acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (subtropical úmido), a coleta dos dados aconteceu em um dia sem precipitação pluviométrica no mês de janeiro de 2024. Foram utilizados 40 tourinhos da raça Nelore, com idades entre 14 e 18 meses no momento da coleta de dados, apresentando uma média de idade de 16 meses (± 2 meses). Os animais foram criados em condições semi-extensivas e todos os animais foram considerados clinicamente saudáveis e sem alterações no escroto no momento da avaliação. As medidas de biometria testicular foram realizadas com auxílio de paquímetro, sendo obtidas as medidas de comprimento e largura do testículo direito e do esquerdo, para efeito da determinação do formato testicular foi utilizada a média de ambos os testículos, sendo o formato determinado pela divisão da largura pelo comprimento testicular e classificado da seguinte forma: longo, razão $\leq 0,5$; longo moderado, razão entre 0,51–0,625; longo oval, razão entre 0,626–0,750; moderadamente oval, razão entre 0,751–0,875, e esférico, razão $> 0,875$. As imagens de Doppler espectral foram obtidas utilizando equipamento de ultrassom, da marca Sonoscape®, modelo A6V. O transdutor linear L741V (5–10 MHz), ajustado para a frequência de 7,5 MHz, posicionado distalmente ao cordão espermático. As variáveis registradas foram velocidade média (VM) (cm/s), velocidade de pico sistólico (VPS) (cm/s), velocidade diastólica final (VDF) (cm/s), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistividade (IR). Os dados coletados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), precedida da verificação dos pressupostos necessários, o nível de significância adotado foi de 5%. Dos 40 animais, 16 foram classificados com formato testicular longo e 24 longo moderado, fato que confirma as informações da literatura científica pois os animais são de origem zebuína e desta forma espera-se testículos de conformação mais alongada. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$), tanto para as variáveis velocimétricas quanto para os índices calculados, sendo os valores: VPS: $18,9 \pm 5,5$ (longo) vs. $22,0 \pm 6,2$ (longo moderado); VDF: $9,4 \pm 3,7$ (longo) vs. $11,0 \pm 4,5$ (longo moderado); VM: $14,0 \pm 4,2$ (longo) vs. $16,7 \pm 4,7$ (longo moderado); IP: $0,52 \pm 0,26$ (longo) vs. $0,49 \pm 0,21$ (longo moderado) e para IR: $0,50 \pm 0,15$ (longo) vs. $0,50 \pm 0,17$ (longo moderado). Possivelmente, pelos animais zebuínos apresentarem formato testicular mais alongado, possuem maior comprimento de vasos e vasos mais finos no plexo pampiniforme, isto permite uma troca mais eficiente de calor no sistema de contracorrente ali presente, esse fato somado as condições bioclimatológicas que provavelmente não desafiaram a termorregulação testicular, podem ter sido determinantes para a não evidencia de diferença significativa entre os grupos, considerando os parâmetros hemodinâmicos aferidos. Desta forma, no presente estudo, o formato testicular não influenciou os parâmetros hemodinâmicos da artéria supratesticular em touros Nelore jovens.

Palavras-chave: biometria testicular, ultrassonografia doppler, fluxo sanguíneo testicular, termorregulação testicular.

Autorizações legais: CEUA/UUNOPAR: n. 02/26

Testicular shape and suprastesticular artery hemodynamics in bulls

Celso Gabriel Ritz¹, Deborah Nakayama Yokomizo¹, Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Fábio Morotti¹, Julia Batistela Giusti¹, Gabriela Rodrigues de Paula¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Flavio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Norte do Paraná
E-mail: gabrielritz007@gmail.com

The use of testicular biometry allows for the assessment of growth and the verification of reproductive alterations that directly impact the seminal quality of the animals. Zebu-origin bulls have testicles with a more elongated shape when compared to animals of European origin. Testicles with a more elongated shape have a larger surface area, which allows for better heat dissipation. For adequate sperm production, it is necessary for the scrotal temperature to be 4 to 6°C below body temperature; therefore, efficient testicular thermoregulation is important, with the testicle shape being one of the factors that interfere with testicular thermoregulation. The objective of this study was to evaluate the changes in testicular hemodynamics in the supra-testicular artery, considering testicular shape. The experiment was conducted at a property located in the municipality of Londrina, PR; according to the Köppen classification, the region's climate is of the Cfa type (humid subtropical). Data collection took place on a day without rainfall in January 2024. Forty young Nellore bulls were used, aged between 14 and 18 months at the time of data collection, with a mean age of 16 months (± 2 months). The animals were raised under semi-extensive conditions, and all were considered clinically healthy with no scrotal alterations at the time of evaluation. Testicular biometry measurements were performed with the aid of a caliper, obtaining the length and width of the right and left testicles. To determine testicular shape, the average of both testicles was used, and the shape was determined by dividing the width by the testicular length, classified as follows: long, ratio ≤ 0.5 ; moderately long, ratio between 0.51–0.625; long oval, ratio between 0.626–0.750; moderately oval, ratio between 0.751–0.875; and spherical, ratio > 0.875 . Spectral Doppler images were obtained using an ultrasound device, Sonoscape® brand, model A6V. The linear transducer L741V (5-10 MHz), adjusted to a frequency of 7.5 MHz, was positioned distally to the spermatic cord. The recorded variables were mean velocity (MV) (cm/s), peak systolic velocity (PSV) (cm/s), end-diastolic velocity (EDV) (cm/s), pulsatility index (PI), and resistivity index (RI). The collected data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), preceded by the verification of necessary assumptions; the significance level adopted was 5%. Of the 40 animals, 16 were classified with a long testicular shape and 24 with a moderately long shape, a fact that confirms information from scientific literature, as the animals are of Zebu origin, and thus, testicles of a more elongated conformation are expected. There was no difference between the groups ($p > 0.05$) for either the velocimetric variables or the calculated indices, with the following values: PSV: 18.9 ± 5.5 (long) vs. 22.0 ± 6.2 (moderately long); EDV: 9.4 ± 3.7 (long) vs. 11.0 ± 4.5 (moderately long); MV: 14.0 ± 4.2 (long) vs. 16.7 ± 4.7 (moderately long); PI: 0.52 ± 0.26 (long) vs. 0.49 ± 0.21 (moderately long); and for RI: 0.50 ± 0.15 (long) vs. 0.50 ± 0.17 (moderately long). Possibly, because Zebu animals have a more elongated testicular shape, possess a greater vessel length, and finer vessels in the pampiniform plexus, this allows for more efficient heat exchange in the countercurrent system present there. This fact, added to the bioclimatological conditions that probably did not challenge testicular thermoregulation, may have been determining factors for the lack of evidence of a significant difference between the groups, considering the hemodynamic parameters measured. Thus, in the present study, testicular shape did not influence the hemodynamic parameters of the supra-testicular artery in young Nellore bulls.

Keywords: testicular biometry, doppler ultrasonography, testicular blood flow, testicular thermoregulation.

Legal authorizations: CEUA/UUNOPAR: n. 02/26

Granuloma espermático em três touros Aberdeen Angus: caracterização clínica e histopatológica

Isadora Teixeira Souto¹, Ana Paula Martini¹, Ariela Ferraz de Loreto¹, Fabricio Barbiero Dutra¹, Laura de Avilla Zampieri¹, Gilson Antônio Pessoa¹

¹Universidade Federal de Santa Maria
E-mail: isadorateixeirasouto@hotmail.com

O granuloma espermático em bovinos é uma afecção crônica, de origem congênita ou adquirida, caracterizada por mineralização do parênquima testicular associada à inflamação granulomatosa, sendo mais frequentemente observado no epidídimo. Essa condição pode estar associada a defeitos nos ductos eferentes, levando à obstrução do fluxo espermático e, quando severa, ao acúmulo e estase de espermatozoides nos túbulos seminíferos, resultando em lesões no parênquima testicular. Consequentemente, há impacto negativo sobre a fertilidade, com redução dos índices reprodutivos e descarte precoce de reprodutores. Relata-se a ocorrência de granuloma espermático em três touros da raça Aberdeen Angus, Puros de Origem, sem parentesco paternal e maternal, com 24 meses de idade, criados em sistema extensivo a pasto, pertencentes a um grupo contemporâneo de 70 animais. Os casos ocorreram no ano de 2025, em um criatório na região central do Rio Grande do Sul. Ao exame clínico, observou-se a circunferência escrotal de 43 cm, valor superior à média da raça, estimada em 36,45 cm. Ambos os testículos apresentaram consistência firme, além de aumento de volume unilateral na gônada direita (n=1) ou esquerda (n=2), associado à azoospermia. A ausência de espermatozoides foi evidenciada em duas tentativas de coleta do ejaculado com intervalo de 45 dias, por massagem das glândulas acessórias via palpação transretal e com o uso de eletroejaculador. Ao exame ultrassonográfico, verificaram-se áreas hiperecogênicas no parênquima dos testículos e em ambas as caudas dos epidídimos. Este padrão ultrassonográfico ocorreu também nos outros dois animais e se manteve no exame subsequente. Foram realizadas punções dos parênquimas testiculares e das caudas dos epidídimos para cultura bacteriana, cujo resultado foi sem crescimento microbiológico. Em um dos touros, com comprometimento da gônada direita, procedeu-se à orquiectomia bilateral, com encaminhamento dos testículos e epidídimos para exame histopatológico. À avaliação macroscópica, observaram-se em ambos os testículos, áreas multifocais esbranquiçadas associadas à calcificação. Microscopicamente, o testículo direito apresentou mineralização acentuada dos túbulos seminíferos, de distribuição multifocal a coalescente, associada a inflamação granulomatosa, atrofia testicular acentuada e fibrose intersticial. Os túbulos seminíferos apresentavam parede delgada e ausência de espermatozoides no lúmen. O testículo esquerdo apresentou alterações semelhantes, porém restritas a aproximadamente 20% do parênquima, enquanto no testículo direito cerca de 90% do tecido estava comprometido. No epidídimo direito, observou-se fibrose multifocal acentuada associada à ausência de espermatozoides, enquanto no epidídimo esquerdo as alterações foram discretas. Os achados clínicos e histopatológicos são compatíveis com granuloma espermático. De acordo com a literatura, a etiologia pode ser multifatorial, envolvendo alterações congênitas ou adquiridas que resultam em obstrução dos ductos espermáticos. Ademais, considerando o caráter congênito da afecção, ressalta-se a necessidade de diagnóstico precoce por meio de exame andrológico pré estação de monta, visando à identificação e o descarte dos indivíduos portadores, a fim de evitar sua permanência no rebanho e a possível transmissão da condição à progênie. Embora mais frequentemente descrito na cabeça do epidídimo, qualquer condição que promova estase espermática pode desencadear a formação de lesões no parênquima testicular resultando em azoospermia.

Palavras-chave: bovinos, granuloma espermático, fibrose testicular, azoospermia.

Autorizações legais: CEUA N° 1147090224

Spermatic Granuloma in Three Aberdeen Angus Bulls: Clinical and Histopathological Characterization

Isadora Teixeira Souto¹, Ana Paula Martini¹, Ariela Ferraz de Loreto¹, Fabricio Barbiero Dutra¹, Laura de Avilla Zampieri¹, Gilson Antônio Pessoa¹

¹Universidade Federal de Santa Maria
E-mail: isorateixeirasouto@hotmail.com

Spermatic granuloma in cattle is a chronic condition of congenital or acquired origin, characterized by mineralization of the testicular parenchyma associated with granulomatous inflammation, most frequently observed in the epididymis. This condition may be associated with defects in the efferent ducts, leading to obstruction of sperm flow and, when severe, to the accumulation and stasis of spermatozoa within the seminiferous tubules, resulting in lesions in the testicular parenchyma. Consequently, there is a negative impact on fertility, with reduced reproductive rates and early culling of breeding animals. This report describes the occurrence of spermatic granuloma in three Purebred Aberdeen Angus bulls, unrelated on both paternal and maternal sides, 24 months of age, raised under an extensive pasture-based system, belonging to a contemporary group of 70 animals. The cases occurred in 2025, in a breeding farm located in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. On clinical examination, a scrotal circumference of 43 cm was observed, a value higher than the breed average, estimated at 36.45 cm. Both testis of firm consistency, in addition to unilateral enlargement of the right (n=1) or left (n=2) gonad, associated with azoospermia. The absence of spermatozoa was confirmed in two semen collection attempts at a 45-day interval, performed by massage of accessory glands via transrectal palpation and by electroejaculation. Ultrasonographic examination revealed hyperechoic areas in the testicular parenchyma and in both epididymal tails. This ultrasonographic pattern was also observed in the other two animals and persisted in subsequent examinations. Fine-needle aspirates of the testicular parenchyma and epididymal tails were collected for bacterial culture, which yielded no microbiological growth. In one bull, with enlargement of the right gonad, bilateral orchietomy was performed, and the testes, epididymides, and ductus deferens were submitted for histopathological examination. On macroscopic evaluation, both testes showed multifocal whitish areas associated with calcification. Microscopically, the right testis showed marked mineralization of the seminiferous tubules, with a multifocal to coalescing distribution, associated with granulomatous inflammation, severe testicular atrophy, and interstitial fibrosis. The seminiferous tubules had thin walls and absence of spermatozoa in the lumen. The left testis showed similar changes, but restricted to approximately 20% of the parenchyma, whereas about 90% of the right testicular tissue was affected. In the right epididymis, marked multifocal fibrosis associated with absence of spermatozoa was observed, whereas in the left epididymis the changes were mild. The clinical and histopathological findings are consistent with spermatic granuloma. According to the literature, the etiology may be multifactorial, involving congenital or acquired alterations that result in obstruction of the spermatic ducts. Furthermore, considering the congenital nature of the condition, the need for early diagnosis through breeding soundness examination prior to the breeding season is emphasized, aiming at identifying and culling affected individuals to prevent their maintenance in the herd and the possible transmission of the condition to offspring. Although more frequently described in the head of the epididymis, any condition that promotes spermatic stasis may trigger the formation of lesions in the testicular parenchyma, resulting in azoospermia.

Keywords: cattle, spermatic granuloma, testicular fibrosis, azoospermia.

Legal authorizations: CEUA N° 1147090224

Hérnia inguino-escrotal em um touro Braford: manejo cirúrgico por herniorrafia associada à orquiectomia unilateral

Laura de Avilla Zampieri¹, Ana Paula Martini¹, Ariela Ferraz de Loreto¹, Gilson Antônio Pessoa¹, Isadora Teixeira Souto¹, Marcelo Fronza Spohr², Petri Bolzan Pacheco³, Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²PampaBov Soluções Veterinárias LTDA, ³Tupancy Assessoria Veterinária
E-mail: lavilla2102@gmail.com

A hérnia inguino-escrotal é uma condição caracterizada pela passagem de conteúdo abdominal para o escroto. A ocorrência no lado esquerdo representa cerca de 90% dos casos, sendo rara a apresentação no lado direito. No presente relato, considerando a ausência de histórico prévio de alterações na bolsa testicular e a maior prevalência de etiologia traumática associada à monta natural em touros adultos, infere-se que a origem seja adquirida, cuja evolução pode resultar em encarceramento de alças intestinais, necrose tecidual, formação de aderências e degeneração testicular, comprometendo a saúde reprodutiva. O objetivo desse relato é descrever a herniorrafia associada à orquiectomia unilateral em um touro Braford de dois anos situado em uma fazenda no Rio Grande do Sul, Brasil. O diagnóstico foi realizado por exame clínico, palpação escrotal e ultrassonografia em modo B e Doppler, que evidenciaram alças intestinais no interior da túnica vaginal, na região proximal do testículo direito. Na ultrassonografia inicial, as alças do intestino delgado mostravam-se viáveis, com trânsito luminal e vascularização preservada ao Doppler, caracterizando quadro não emergencial e permitindo a criopreservação do sêmen antes do procedimento, conforme interesse do proprietário. Como o touro não apresentava alterações clínicas no escroto contralateral, optou-se pela coleta do material para avaliação da qualidade e preservação genética, para possível utilização futura em protocolos de inseminação artificial. O espermograma pós-descongelamento demonstrou motilidade total de 35% e progressiva de 15%, avaliada em sistema AndroScope (Minitube). Três dias depois, nova avaliação evidenciou que, embora ainda houvesse fluxo sanguíneo visto ao Doppler, o trânsito luminal estava interrompido, sugerindo encarceramento do segmento intestinal e indicando a necessidade de intervenção cirúrgica. A sedação e analgesia foram induzidas com xilazina 2% (0,05 mg/kg IM) e dipirona (25 mg/kg IM), respectivamente, e a anestesia local realizada com lidocaína 2% (7 mg/kg SC). Após tricotomia e antisepsia do local cirúrgico com iodopovidona 1% e clorexidina 2%, realizou-se orquiectomia aberta unilateral por meio de incisão lateral. O epidídimo e o testículo ipsilaterais apresentavam extensas aderências fibrosas entre as túnicas vaginais parietal e visceral. O cordão espermático foi ligado com ligadura transfixante de náilon 1-0, seguida de síntese subcutânea com poliglactina 1-0 em padrão contínuo simples. A pele foi suturada com pontos simples intermitentes em náilon 1-0, mantendo abertura para drenagem e cicatrização por segunda intenção. Em seguida, realizou-se herniorrafia por incisão ventrolateral direita de 15 cm, permitindo acesso direto ao anel inguinal. O conteúdo herniado foi reposicionado na cavidade abdominal, e o anel parcialmente fechado com poliéster nº 4 em quatro pontos simples intermitentes. As sínteses muscular e subcutânea foram feitas com poliglactina nº 1 em padrão contínuo simples, e a pele com náilon nº 1 em padrão festonado. Após a recuperação dos efeitos sedativos, o touro foi auxiliado a levantar-se do decúbito. No período pós-operatório imediato e por quatro dias seguintes, foi administrada penicilina G procaína em associação com penicilina G benzatina (20.000 UI/kg IM), além de meloxicam (0,5 mg/kg IM) e ducha local com água fria uma vez ao dia. A avaliação clínica, realizada 10 dias após a cirurgia, demonstrou recuperação satisfatória, sem complicações locais, testículo contralateral com aspecto normal e bom estado geral. No entanto, ainda não há informações sobre sua atividade reprodutiva. Este caso sugere que a associação de orquiectomia unilateral e herniorrafia é uma alternativa para prevenir degeneração testicular bilateral. Destaca-se ainda a relevância do relato, uma vez que há poucas descrições na literatura sobre herniorrafias inguinais do lado direito em touros.

Palavras-chave: touro, hérnia inguino-escrotal, orquiectomia, herniorrafia, cirurgia reprodutiva.

Autorizações legais: CEUA 5012291024

Inguinal–Scrotal Hernia in a Braford Bull: Surgical Management by Herniorrhaphy Associated with Unilateral Orchiectomy

Laura de Avilla Zampieri¹, Ana Paula Martini¹, Ariela Ferraz de Loreto¹, Gilson Antônio Pessoa¹, Isadora Teixeira Souto¹, Marcelo Fronza Spohr², Petri Bolzan Pacheco³, Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²PampaBov Soluções Veterinárias LTDA, ³Tupancy Assessoria Veterinária
E-mail: lavilla2102@gmail.com

Inguinoscrotal hernia is a condition characterized by the passage of abdominal contents into the scrotum. Occurrence on the left side represents approximately 90% of cases, with right-sided being rare. In the present report, considering the absence of a previous history of scrotal alterations and the higher prevalence of traumatic etiology associated with natural mating in adult bulls, the origin is inferred to be acquired. Progression may lead to intestinal incarceration, necrosis, adhesion formation, and testicular degeneration, compromising reproduction. This report describes herniorrhaphy associated with unilateral orchiectomy in a two-year-old Braford bull located on a farm in Rio Grande do Sul, Brazil. Diagnosis was performed through clinical examination, scrotal palpation and B-mode and Doppler ultrasonography, which demonstrated intestinal loops within the vaginal tunic in the proximal region of the right testicle. On the initial ultrasound image, the small intestinal loops indicated viability, luminal content passage and preserved vascularization on Doppler, characterizing a non-emergency condition at that time, allowing for semen cryopreservation prior to the procedure, as requested by the owner. The bull showed no clinical abnormalities in the contralateral scrotal segment; therefore, semen collection was performed to assess ejaculate quality and preserve the animal's genetic material for possible future use in artificial insemination programs. Semen analysis demonstrated post-thaw total motility of 35% and progressive motility of 15%, assessed using the AndroScope system (Minitube). A new evaluation performed three days later showed that, although blood flow was still present on Doppler, luminal transit had been interrupted, indicating possible incarceration of the intestinal segment and requiring surgical intervention. Sedation and analgesia were induced with 2% xylazine (0.05 mg/kg IM) and dipyrone (25 mg/kg IM), respectively, and local anesthesia was performed with 2% lidocaine (7 mg/kg SC). After trichotomy and antisepsis of the surgical site with 1% povidone-iodine and 2% chlorhexidine, unilateral open orchiectomy was performed via a lateral incision. The epididymis and ipsilateral testicle showed extensive fibrous adhesions between the parietal and vaginal tunics. The spermatic cord was ligated using a transfixing ligature with nylon 1-0, followed by subcutaneous closure with polyglactin 1-0 in a simple continuous pattern. The skin was sutured with simple interrupted stitches using nylon 1-0, leaving an opening for drainage and healing by second intention. Subsequently, herniorrhaphy was performed through a 15 cm right ventrolateral incision, allowing direct access to the inguinal ring. The herniated segment was repositioned into the abdominal cavity, and the ring was partially closed with polyester No. 4 using four simple interrupted sutures. Muscle and subcutaneous layers were closed with simple continuous sutures using polyglactin No. 1, and the skin was sutured in a Ford interlocking pattern with nylon No. 1. After recovery from sedation, the bull was assisted to stand. In the immediate postoperative period and for the next four days, procaine penicillin G was administered combination with benzathine penicillin G (20,000 IU/kg IM), along with meloxicam (0.5 mg/kg IM) and a local cold water lavage once a day. Clinical evaluation performed 10 days after surgery showed satisfactory recovery, with no local complications, normal appearance of the contralateral testicle, and good general condition. However, no information is yet available regarding reproductive function. This case indicates that the association of unilateral orchiectomy with herniorrhaphy constitutes an alternative approach to avoid the risk of degeneration in both testicles. Additionally, the relevance of this report is noteworthy, as there are few descriptions in the literature of right-sided inguinal herniorrhaphy in bulls.

Keywords: bull, inguinal–scrotal hernia, Orchiectomy, Herniorrhaphy, reproductive surgery.

Legal authorizations: CEUA 5012291024

Hemodinâmica da artéria supratesticular de touros jovens entre regiões de diferentes zonas climáticas

Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Celso Gabriel Ritz¹, Julia Batistela Giusti¹, Deborah Nakayama Yokomizo¹, Gabriela Rodrigues de Paula¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Fábio Morotti¹, Flavio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Norte do Paraná
E-mail: vgaldioli@hotmail.com

A termorregulação testicular é essencial para a espermatogênese, tendo a hemodinâmica testicular papel fundamental. O presente estudo avaliou a hemodinâmica testicular de touros em duas regiões climáticas distintas. O experimento foi realizado em duas propriedades, a primeira localizada no município de Santana do Livramento - RS (Ambiente 1) com classificação do clima segundo Köppen-Geiger “Cfa” (clima subtropical), avaliados no mês de janeiro. A segunda coleta foi realizada em abril, em propriedade localizada em Araçatuba - SP (Ambiente 2), clima classificado como “Aw” (clima tropical com inverno seco) (Köppen-Geiger), com temperaturas elevadas ao longo de todo o ano. Foram utilizados os mesmos 33 touros jovens da raça Braford, idade média de 16 meses na primeira coleta (janeiro) e aos 20 meses na segunda coleta. As informações registradas foram velocidade média (VM), velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade de pico diastólico (VDF), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistividade (IR). Para a comparação entre os diferentes grupos utilizou-se análise de variância (ANOVA), o nível mínimo de significância foi de 5%. Este estudo tem como diferencial a avaliação longitudinal dos mesmos touros após a movimentação entre dois ambientes bioclimaticamente diferentes, separados por uma distância linear de aproximadamente 1.215 km, permitindo a exposição do mesmo grupo experimental a condições edafoclimáticas distintas. O ambiente 1 (RS) apresentou durante o período de coleta ITU médio de $67,8 \pm 1,2$, sendo o valor mínimo de 66,7 e o máximo de 69,4, já no ambiente 2 (SP) o ITU médio foi de $75,9 \pm 1,2$, com amplitude entre 74,6 e 77,5. A comparação de VPS, VM e VDF entre os dois ambientes, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entretanto ao serem comparados IP e IR houve diferença significativa ($p < 0,05$), sendo ambas medidas superiores no ambiente 1. Em situações de bioclimatológicas adequadas (Ambiente 1) há menor necessidade da ativação dos mecanismos termorregulatórios, entre eles o da vasodilatação, favorecendo a manutenção de maior tônus basal nas artérias testiculares e supratesticular, reduzindo proporcionalmente o componente diastólico e aumentando a oposição funcional ao fluxo. No ambiente 2, os animais enfrentaram um desafio bioclimatológico, caracterizado por leve estresse térmico, desencadeando ajustes circulatórios. Entre esses, destaca-se a vasodilatação periférica favorecendo o aumento da dissipação de calor pela pele e reduzindo a impedância do leito tecidual irrigado, refletindo na maior complacência vascular e menor resistência ao fluxo pulsátil. Essa condição promove um padrão de perfusão mais contínuo, com menor oscilação entre os componentes sistólico e diastólico, resultando na redução de IP e IR. O comportamento fisiológico observado é consistente no presente trabalho, através da porcentagem de redução entre a VPS em relação a VM e de VPS com VDF, sendo as reduções significativamente maiores ($p < 0,05$) no ambiente 1, sendo a porcentagem de redução VPS/VM $27,1 \pm 11,2$ % para o ambiente 1 e $19,6 \pm 7,2$ para o 2. Considerando a redução VPS/VE foram respectivamente $51,2 \pm 17,5$ % e $42,7 \pm 12,3$ %, comprovando a menor oscilação no ambiente 2. Esses achados sugerem que os ajustes vasculares pelo estresse térmico modulam a impedância vascular mensuráveis nos índices Doppler. As evidências sugerem que o IR e o IP não apenas caracterizam a resistência vascular, mas também refletem a capacidade de adaptação hemodinâmica aos desafios fisiológicos, assim, esses índices oferecem marcadores indiretos e aplicáveis à investigação da termorregulação testicular. Pode-se concluir que o desafio bioclimatológico foi suficiente de promover a ativação dos mecanismos termorregulatórios, sendo as alterações hemodinâmicas (redução de IP e IR) detectáveis por ultrassonografia Doppler, associados a menor impedância vascular. Essa diminuição também influenciou na menor redução proporcional da VM e VDF quando comparadas com a VPS.

Palavras-chave: ultrassonografia doppler, termorregulação, estresse térmico, touros, hemodinâmica testicular.

Autorizações legais: CEUA/Uel: n. 18656/2014/58

Hemodynamic evaluation of the suprastesticular artery in young bulls across distinct climatic zones

Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Celso Gabriel Ritz¹, Julia Batistela Giusti¹, Deborah Nakayama Yokomizo¹, Gabriela Rodrigues de Paula¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Fábio Morotti¹, Flavio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Universidade Estadual de Londrina, ²Universidade Norte do Paraná
 E-mail: vgaldioli@hotmail.com

Testicular thermoregulation is essential for spermatogenesis, with testicular hemodynamics playing a fundamental role. This study evaluated testicular hemodynamics in bulls from two distinct climatic regions. The experiment was conducted on two farms: the first, located in Santana do Livramento, RS (Environment 1), holds a Köppen–Geiger climate classification of “Cfa” (subtropical) and was evaluated in January. The second data collection occurred in April on a farm in Araçatuba, SP (Environment 2), with a climate classified as “Aw” (tropical with a dry winter), characterized by high temperatures throughout the year. The study followed 33 young Braford bulls, with a mean age of 16 months at the first collection and 20 months at the second. Recorded parameters included mean velocity (MV), peak systolic velocity (PSV), end-diastolic velocity (EDV), pulsatility index (PI), and resistive index (RI). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups, with a minimum significance level of 5%. A distinctive feature of this study is the longitudinal evaluation of the same animals after relocation between two bioclimatically distinct environments, separated by an approximate linear distance of 1,215 km, which exposed the experimental group to varying edaphoclimatic conditions. Environment 1 (RS) presented an average temperature–humidity index (THI) of 67.8 ± 1.2 (range: 66.7–69.4). In Environment 2 (SP), the average THI was 75.9 ± 1.2 (range: 74.6–77.5). Comparisons of PSV, MV, and EDV between environments showed no significant differences ($p > 0.05$). However, PI and RI differed significantly ($p < 0.05$), with higher values observed in Environment 1. Under more temperate bioclimatic conditions (Environment 1), there is less demand for thermoregulatory vasodilation, favoring the maintenance of a higher basal tone in testicular and suprastesticular arteries; this proportionally reduces the diastolic component and increases functional opposition to flow. In Environment 2, animals faced a bioclimatic challenge characterized by mild heat stress, which triggered circulatory adjustments. Among these, peripheral vasodilation promotes increased heat dissipation through the skin and reduces impedance in the irrigated tissue bed, resulting in greater vascular compliance and lower resistance to pulsatile flow. This facilitates a more continuous perfusion pattern, with reduced oscillation between systolic and diastolic components, resulting in lower PI and RI. The physiological behavior observed is supported by the analysis of percentage reduction between PSV relative to MV and PSV relative to EDV, which were significantly greater ($p < 0.05$) in Environment 1. The percentage reduction for PSV/MV was 27.1 ± 11.2 in Environment 1 and 19.6 ± 7.2 in Environment 2. For PSV/EDV, reductions were 51.2 ± 17.5 and 42.7 ± 12.3 , respectively, confirming lower oscillation in Environment 2. These findings suggest that vascular adjustments induced by heat stress modulate vascular impedance, which is measurable through Doppler indices. Evidence indicates that RI and PI not only characterize vascular resistance but also reflect the capacity for hemodynamic adaptation to physiological challenges. Consequently, these indices serve as indirect, applicable markers for investigating testicular thermoregulation. In conclusion, the bioclimatic challenge was sufficient to activate thermoregulatory mechanisms, resulting in hemodynamic changes (reductions in PI and RI) detectable by Doppler ultrasonography. This reduction, associated with lower vascular impedance, also influenced the smaller proportional decrease in MV and EDV compared to PSV.

Keywords: doppler ultrasonography, thermoregulation, heat stress, bulls, testicular hemodynamics.

Legal authorizations: CEUA/UDEL: n. 18656/2014/58

Impacto relacionado ao touro na eficiência reprodutiva e no custo por prenhez em programas de IATF em bovinos de corte

Fabricio Barbiero Dutra¹, Isadora Teixeira Souto¹, Filipe Lopes Albarnaz¹, Emídio Ferreira Machado Filho², Ana Paula Martini¹, Gilson Antônio Pessoa¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²Reprobiovet Consultoria
 E-mail: fabriciodutra765@gmail.com

O objetivo deste estudo foi mensurar o impacto do reprodutor (touro) escolhido para ser utilizado em programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) nos resultados reprodutivos e econômicos em uma fazenda comercial com atividade de cria em gado taurino de corte no sul do Brasil (Rio Grande do Sul). Foram utilizados 12 touros das raças Angus (n = 1, C), Braford (n = 6, A, B, H, I, K, L), Brangus (n = 4, E, F, G, J) e Nelore (n = 1, D), cujas doses de sêmen foram distribuídas de forma randomizada entre os lotes de fêmeas predominantemente das raças Brangus e Braford ao longo de duas estações reprodutivas (2022 e 2023), resultando em 11.480 inseminações. Todas as fêmeas foram manejadas sob as mesmas condições nutricionais e sanitárias, seguindo o protocolo reprodutivo adotado pela propriedade. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal aos 30 dias após a IATF (DG30) e repetido aos 120 dias de gestação (DG120). Foram calculados: (i) taxa de prenhez à IATF (P/IA), determinada pela razão entre o número de fêmeas gestantes ao DG30 e o número total de fêmeas inseminadas, expressa em porcentagem; (ii) perda gestacional (PG), calculada como a diferença entre o número de fêmeas gestantes aos 30 e aos 120 dias, dividida pelo número de fêmeas gestantes aos 30 dias, expressa em porcentagem; (iii) prenhez final ou prenhez aos 120d (P120), estimada a partir da P/IA ajustada pela perda gestacional; (iv) taxa de desmame (TD), definida como a proporção de bezerras desmamadas em relação ao total de fêmeas inseminadas. Para a avaliação econômica, foi calculado o custo por prenhez (CP) de cada reprodutor, considerando o custo total do protocolo de IATF (sêmen + protocolo hormonal + honorários + manejo), dividido pela taxa de prenhez final obtida para cada touro. O valor da dose de sêmen por touro utilizado foi de US\$ 5.2 ± 1.3. Os touros foram classificados em quatro grupos (quartis) de acordo com a taxa de prenhez à IATF (DG30): G1- P/IA ≥ 60%; G2 ≥ 55% < 60%; G3 ≥ 44% < 55%; G4 ≤ 44%. Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas e submetidos à análise estatística utilizando o software SAS *OnDemand for Academics*. As variáveis foram analisadas por meio do procedimento PROC GLM, considerando os efeitos fixos de touro, ano e grupo. As médias foram comparadas utilizando Teste Tukey a nível de 5% (P < 0,05). A P/IA média obtida foi de 49,3% (5.659/11.480), variando de 26,7 a 79,6%. A P/IA por touro foi 79,6% (A), 77% (B), 67,3% (C), 60% (D), 59,4% (E), 55,3% (F), 54,1% (G), 51,1% (H), 44,3% (I), 35,1% (J), 33,3% (K) e 26,7% (L). A P/IA por grupo foi 76,3 ± 6,5%; 59,1 ± 2,6%; 49,9 ± 5% e 33,6 ± 4,4% para G1, G2, G3 e G4, respectivamente. A taxa de PG foi 14,6 ± 11%, sendo 10 ± 0,3%; 6 ± 4,1%; 11 ± 5,3% e 32 ± 7%; para G1, G2, G3 e G4, respectivamente (P < 0,001). A P120 foi 46,8 ± 17,5%, sendo G1 (67,7 ± 6%) e G2 (54,7 ± 5,7%) superiores a G3 (44,6 ± 7,8%) e G4 (21,7 ± 5%) (P < 0,0001). Destaca-se os touros D e E (G2) que tiveram os menores valores de PG, 1,5 e 4,2% respectivamente e o touro L teve a maior PG (40%) (P < 0,0001). Os touros do quartil 1 mostraram os melhores resultados de prenhez final, A (71,8%), B (69,5%) e C (60,4%) (P = 0,001). A TD geral foi 43,5 ± 19,8%, sendo 65,9 ± 5,9%; 53,6 ± 5,8%; 43,1 ± 9,3% e 12,4 ± 8,3% para G1, G2, G3 e G4 respectivamente (P < 0,0001). Destaca-se os touros A e B que tiveram 70 e 68% de TD, respectivamente. E por fim, o CP, foi menor para G1 com US\$ 32,9 ± 3,09 e G2 com US\$ 40,6 ± 4,62 quando comparado com G3 de US\$ 50,3 ± 9,28 e G4 de US\$ 105,5 ± 28,17 (P = 0,001). Os índices de fertilidade avaliados neste experimento (P/IA, PG e TD) foram influenciados pelo touro utilizado. Neste estudo foi possível concluir que a eficiência econômica na cria é dependente do reprodutor utilizado no programa de IATF.

Palavras-chave: análise econômica, bovino de corte, fertilidade, IATF, touro.

Autorizações legais: CEUA N° 1147090224

Agradecimentos e financiadores: Embryolab - Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria

Impact of Sire on Reproductive Efficiency and Cost per Pregnancy in FTAI Programs in Beef Cattle

Fabricio Barbiero Dutra¹, Isadora Teixeira Souto¹, Filipe Lopes Albarnaz¹, Emídio Ferreira Machado Filho², Ana Paula Martini¹, Gilson Antônio Pessoa¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²Reprobiovet Consultoria
E-mail: fabriciodutra765@gmail.com

The objective of this study was to evaluate the impact of sire selection for use in Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) programs on reproductive and economic outcomes in a commercial beef cattle operation in southern Brazil (Rio Grande do Sul). A total of 12 bulls were used: Angus (n = 1, C), Braford (n = 6, A, B, H, I, K, L), Brangus (n = 4, E, F, G, J), and Nelore (n = 1, D). Semen doses were randomly distributed among groups of females, predominantly Brangus and Braford, over two breeding seasons (2022 and 2023), resulting in 11,480 inseminations. All females were managed under the same nutritional and health conditions, following the farm's reproductive protocol. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography at 30 days after FTAI (DG30) and repeated at 120 days of gestation (DG120). The following variables were calculated: (i) pregnancy rate to AI (P/AI), defined as the proportion of females diagnosed pregnant at DG30 relative to the total number of inseminated females, expressed as a percentage; (ii) pregnancy loss (PL), calculated as the difference between the number of pregnant females at 30 and 120 days divided by the number of pregnant females at 30 days, expressed as a percentage; (iii) final pregnancy rate or pregnancy at 120 days (P120), estimated from P/AI adjusted for pregnancy loss; and (iv) weaning rate (WR), defined as the proportion of calves weaned relative to the total number of inseminated females. For the economic evaluation, the cost per pregnancy (CP) was calculated for each sire, considering the total cost of the FTAI protocol (semen + hormonal protocol + vet honorary + livestock management), divided by the final pregnancy rate obtained for each bull. The average semen dose cost per sire was US\$ 5.2 ± 1.3. Bulls were classified into four groups (quartiles) according to pregnancy rate at DG30: G1 (P/AI ≥ 60%), G2 (≥ 55% and < 60%), G3 (≥ 44% and < 55%), and G4 (≤ 44%). Data was organized in spreadsheets and analyzed using SAS OnDemand for Academics. Variables were analyzed using the PROC GLM procedure, considering the fixed effects of sire, year, and group. Means were compared using Tukey's test at a 5% significance level (P < 0.05). The overall P/AI was 49.3% (5,659/11,480), ranging from 26.7% to 79.6%. Pregnancy rates by sire were: 79.6% (A), 77.0% (B), 67.3% (C), 60.0% (D), 59.4% (E), 55.3% (F), 54.1% (G), 51.1% (H), 44.3% (I), 35.1% (J), 33.3% (K), and 26.7% (L). Mean P/AI by group was 76.3 ± 6.5%, 59.1 ± 2.6%, 49.9 ± 5.0%, and 33.6 ± 4.4% for G1, G2, G3, and G4, respectively. Pregnancy loss averaged 14.6 ± 11.0%, with values of 10.0 ± 0.3%, 6.0 ± 4.1%, 11.0 ± 5.3%, and 32.0 ± 7.0% for G1, G2, G3, and G4, respectively (P < 0.001). The final pregnancy rate (P120) averaged 46.8 ± 17.5%, with G1 (67.7 ± 6.0%) and G2 (54.7 ± 5.7%) outperforming G3 (44.6 ± 7.8%) and G4 (21.7 ± 5.0%) (P < 0.0001). Notably, sires D and E (G2) showed the lowest pregnancy loss rates (1.5% and 4.2%, respectively), whereas sire L showed the highest (40%) (P < 0.0001). Sires in the top quartile (G1) achieved the highest final pregnancy rates: A (71.8%), B (69.5%), and C (60.4%) (P = 0.001). The overall weaning rate was 43.5 ± 19.8%, with values of 65.9 ± 5.9%, 53.6 ± 5.8%, 43.1 ± 9.3%, and 12.4 ± 8.3% for G1, G2, G3, and G4, respectively (P < 0.0001). Sires A and B stood out, with weaning rates of 70% and 68%, respectively. Finally, cost per pregnancy was lowest for G1 (US\$ 32.9 ± 3.09) and G2 (US\$ 40.6 ± 4.62), compared to G3 (US\$ 50.3 ± 9.28) and G4 (US\$ 105.5 ± 28.17) (P = 0.001). Fertility parameters evaluated in this study (P/AI, PL, and WR) were significantly influenced by the sire. It can be concluded that economic efficiency in beef cow-calf systems is strongly dependent on sire selection within FTAI programs.

Keywords: beef cattle, bull fertility, FTAI, economic analysis, sire effect.

Legal authorizations: CEUA N° 1147090224

Acknowledgments and funders: Embryolab - Department of Large Animal Clinic, Federal University of Santa Maria

Influência da astaxantina sobre a qualidade seminal de touros *Bos indicus* com baixa congelabilidade: efeitos pré e pós-criopreservação

Joice Maria Bazerla Andreta¹, André Maciel Crespilho², Laura Fernanda Sechirolli da Silva¹, Cláudia Maria Herédias Ribas¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Frederico Ozanan Papa¹, Lindsay Unno Gimenes¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Central Bela Vista
 E-mail: joice.andreta@unesp.br

Características individuais de desempenho e adaptação podem comprometer a qualidade seminal de reprodutores bovinos em centrais de sêmen, frequentemente associadas a estresse oxidativo, com impactos negativos na criopreservação e produção de doses. Nesse contexto, a suplementação com antioxidantes surge como estratégia de modulação do balanço redox, destacando-se a astaxantina devido ao elevado potencial de ação. No presente estudo, objetivou-se avaliar a suplementação oral da astaxantina sobre a qualidade espermática pré- e pós-criopreservação do sêmen de touros *Bos indicus* com histórico de baixa congelabilidade seminal. Foram utilizados 14 touros da raça Nelore, com histórico de baixa qualidade espermática, distribuídos em grupo controle (CONT=7) e grupo tratado (ASTX=7), submetidos à suplementação oral de 0,5 mg/kg de astaxantina por 60 dias. Para a suplementação, associou-se a astaxantina em pó a 50 g de sal mineral bovino (Fosbovi® Pronto, Tortuga Cia. Zootécnica Agrária). O grupo CONT recebeu placebo referente ao mesmo sal mineral. O fornecimento de ambos os grupos ocorreu uma vez ao dia, por 60 dias, acompanhando a dieta ofertada pela manhã, com monitoramento dos animais até a ingestão completa. As colheitas de sêmen ocorreram ao longo dos períodos de pré-suplementação (PRE – n=170; jan a mar), suplementação (SUP – n=111; abr-mai), pós-suplementação imediata (PSI – n=51; jun) e pós-suplementação tardia (PST – n=85; jul-ago), possibilitando a análise de 417 ejaculados. A motilidade (%) e vigor (1-5) pré-criopreservação foram avaliados subjetivamente sob microscopia óptica. A morfologia espermática foi realizada por câmara úmida em microscópio de contraste de interferência diferencial (BX53RF®, Olympus). Os defeitos foram divididos em maiores e menores, e subdivididos quanto à origem de formação (testicular e epididimário). A cinética espermática foi avaliada pelo sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA; IVOS - II, Hamilton Thorne Research), considerando-se as variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). A integridade de membrana e o estresse oxidativo foram analisados por citometria de fluxo. Ademais, avaliou-se a produção de ejaculados submetidos à criopreservação, bem como o total de doses produzidas. As variáveis de cinética espermática, morfologia e produção de ejaculados foram analisadas por medidas repetidas no tempo (MIXED – SAS 9.4), considerando os efeitos de tratamento, período e interação. Para as variáveis de estresse oxidativo e integridade de membranas, incluíram-se também o efeito do tempo de análise (teste de termorresistência lento). As medidas foram ajustadas por LSMEANS e comparadas por PDIFF ($P<0,05$). Na avaliação pré-criopreservação, observou-se interação grupo*período para MT ($59,86\pm 4,68\%$ vs $46,03\pm 5,14\%$; $p<0,01$) e vigor ($3,23\pm 0,18$ vs $2,55\pm 0,20$; $p<0,01$), além de redução nos defeitos totais ($24,75\pm 2,77\%$ vs $32,90\pm 3,21\%$; $p=0,01$), e defeitos maiores testiculares ($8,74\pm 2,08\%$ vs $10,25\pm 2,27\%$; $p=0,05$), com melhora dos parâmetros espermáticos no grupo ASTX, especialmente no período pós-suplementação tardia. Entretanto, não houve diferenças entre os grupos para a cinética espermática, a integridade de membranas e o estresse oxidativo pós-criopreservação. A despeito disso, verificou-se incremento numérico de 69% de ejaculados destinados à criopreservação, seguido de incremento de 19% na liberação de doses comerciais no grupo suplementado. Conclui-se que a suplementação oral de astaxantina promove efeitos benéficos sobre a qualidade espermática pré-criopreservação de touros com baixa aptidão seminal, contribuindo para melhoria do desempenho produtivo, porém sem impacto significativo sobre os parâmetros pós-criopreservação, indicando a necessidade de novos estudos.

Palavras-chave: astaxantina, bovinos, estresse oxidativo, sêmen, reprodução.

Autorizações legais: CEUA/FCAV-UNESP: 2937/21

Agradecimentos e financiadores: Apoio financeiro da CAPES (Código Financeiro 001) e da FAPESP (Processo nº 2021/13932-5)

Influence of astaxanthin on the semen quality of *Bos indicus* bulls with low freezability: pre- and post-cryopreservation effects

Joice Maria Bazerla Andreta¹, André Maciel Crespilho², Laura Fernanda Sechiroli da Silva¹, Cláudia Maria Herédias Ribas¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Frederico Ozanan Papa¹, Lindsay Unno Gimenes¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Central Bela Vista
 E-mail: joice.andreta@unesp.br

Individual performance and adaptation characteristics can compromise the seminal quality of bull in sire semen centers, often associated with oxidative stress, with negative impacts on cryopreservation and dose production. In this context, the supplementation with antioxidants becomes a strategy to modulate the redox balance, with astaxanthin standing out due to its high potential. In the present study, the aim was to evaluate the oral supplementation of astaxanthin on the sperm quality pre- and post-cryopreservation of *Bos indicus* bulls with a history of low seminal freezability. Fourteen Nelore bulls with a history of low sperm quality were assigned into a control (CONT=7) and a treated group (ASTX=7), subjected to oral supplementation of 0.5 mg/kg of astaxanthin for 60 days. For supplementation, astaxanthin powder was combined with 50 g of bovine mineral salt (Fosbovi® Pronto, Tortuga Cia. Zootécnica Agrária). The CONT group received a placebo of the same mineral salt. The supplement was offered to both groups once a day, for 60 days, with the diet of the morning. The monitoring of the animals was done until complete ingestion of the supplement. The semen collections occurred throughout the pre-supplementation periods (PRE – n=170; Jan to Mar), supplementation (SUP – n=111; Apr-May), immediate post-supplementation (PSI – n=51; Jun), and late post-supplementation (PST – n=85; Jul-Aug), enabling the analysis of 417 ejaculates. The pre-cryopreservation motility (%) and vigor (1-5) were subjectively evaluated under optical microscopy. Sperm morphology was performed using a wet chamber under a differential interference contrast microscope (BX53RF®, Olympus). The sperm defects were categorized in major and minor and, then, according the origin of formation (testicular or epididymal). Sperm kinetics were evaluated using the computer-assisted sperm analysis system (CASA; IVOS - II, Hamilton Thorne Research), considering the variables: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), straightness (STR, %), and linearity (LIN, %). The membrane integrity and oxidative stress were analyzed by flow cytometry. Moreover, the production of ejaculates subjected to cryopreservation, as well as the total number of doses produced, were evaluated. The variables of sperm kinetics, morphology, and ejaculate production were analyzed using repeated measures (MIXED – SAS 9.4), considering the effects of treatment, period, and interaction. For the variables of oxidative stress and membrane integrity, the effect of analysis time (slow thermoresistance test) was also included. The measurements were adjusted by LSMEANS and compared by PDIFF ($P < 0.05$). In the pre-cryopreservation evaluation, a group*period interaction was observed for TM ($59.86 \pm 4.68\%$ vs $46.03 \pm 5.14\%$; $p < 0.01$) and vigor (3.23 ± 0.18 vs 2.55 ± 0.20 ; $p < 0.01$), in addition to a reduction in total defects ($24.75 \pm 2.77\%$ vs $32.90 \pm 3.21\%$; $p = 0.01$), and major testicular defects ($8.74 \pm 2.08\%$ vs $10.25 \pm 2.27\%$; $p = 0.05$), with improvement in sperm parameters in the ASTX group, especially in the late post-supplementation period. However, no differences between the groups for sperm kinetics, membrane integrity, and post-cryopreservation oxidative stress were found. Despite this, a numerical increase of 69% in ejaculates destined to cryopreservation was observed, followed by a 19% increase in the release of commercial doses in the supplemented group. In conclusion, the oral supplementation with astaxanthin promotes beneficial effects on the pre-cryopreservation sperm quality of bulls with low seminal freezability, contributing to the improvement of productive performance, although with no significant impact on post-cryopreservation parameters, indicating the need for further studies.

Keywords: astaxanthin, cattle, oxidative stress, semen, reproduction.

Legal authorizations: CEUA/UNESP: 2937/21

Acknowledgments and funders: Financial support from CAPES (Financial Code 001) and FAPESP (Process No. 2021/13932-5)

Limitações da motilidade espermática na detecção da subfertilidade em touros: *insights* do proteoma mitocondrial de touros

Yasmin El Hayek Martins¹, Saurabh Tiwari², André Maciel Crespilho³, Paulina Betancur Guerra¹, Marcos Gomides Carvalho¹, John Patrick Kastelic², Jacob Chacko Thundathil², Angelo Gardim De Cesare⁴, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²University of Calgary, ³Central Bela Vista, ⁴Gestão e Monitoramento Agropecuário
E-mail: yasmin.hayek@unesp.br

A subfertilidade em touros representa um desafio diagnóstico na reprodução bovina, uma vez que a motilidade espermática apresenta capacidade limitada na predição da fertilidade, sugerindo a presença de diferenças moleculares, incluindo alterações mitocondriais. Neste contexto, este estudo investigou a relação entre o proteoma mitocondrial e a motilidade espermática em touros de alta e baixa fertilidade. Amostras de 33 touros Nelore, provenientes de 8.286 inseminações em programas de IATF, foram classificadas com base nas taxas de prenhez aos 30 e 90 dias (quartis 25 e 75%), resultando na seleção de touros de alta (HF; n=5; taxa média de prenhez = 60,6%) e baixa fertilidade (LF; n=6; taxa média de prenhez = 23,0%), evidenciando a distinção entre os grupos. O sêmen, proveniente de palhetas comerciais previamente aprovadas quanto aos parâmetros seminais segundo os critérios de qualidade das centrais para comercialização, foi descongelado, e a motilidade total (MT) e progressiva (MP) foram avaliadas por sistema computadorizado (CASA; IVOS I, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose, e submetidas a análise proteômica (nLC-MS/MS, Orbitrap). A abundância relativa das proteínas foi expressa em emPAI normalizado, mantendo em cada grupo apenas as identificadas em pelo menos 60% das amostras, e correlacionada com os parâmetros de motilidade por meio de correlação de Spearman, considerando apenas associações fortes e significativas ($r \geq 0,8$ ou $r \leq -0,8$; $P < 0,05$ (*) e $P < 0,01$ (**)). Não foram observadas diferenças entre HF e LF para MT e MP, indicando que parâmetros convencionais não discriminam adequadamente o potencial fertilizante e sugerindo que outros aspectos funcionais podem estar envolvidos. Padrões moleculares distintos foram observados entre os grupos, particularmente nas subunidades do complexo I da cadeia respiratória. Em touros LF, foram observadas correlações positivas com a motilidade, incluindo MP: *NDUFA12* ($r = 0.943^*$), *NDUFB10* ($r = 1.000^{**}$), *NDUFS1* ($r = 0.943^*$) e MT: *NDUFV1* ($r = 0.886^*$) e *LDHA* ($r = 0.886^*$). Em contraste, em touros HF, observou-se predominância de correlações negativas com a motilidade total, incluindo *NDUFB9* ($r = -0.925^*$), *NDUFC2* ($r = -0.955^*$) e *NDUFS1* ($r = -0.931^*$), além de correlações positivas para *NDUFA7* ($r = 0.982^{**}$) e *NDUFV1* ($r = 0.999^{**}$). Esse comportamento sugere diferenças na regulação do transporte de elétrons e na eficiência bioenergética entre os grupos. Em touros LF, a associação consistente entre subunidades do complexo I e a motilidade, incluindo a motilidade progressiva, sugere maior exigência sobre o metabolismo energético para sustentação do movimento espermático, possivelmente refletindo um mecanismo compensatório para manutenção da produção de ATP. Em contraste, em touros HF, o padrão heterogêneo de correlações, restrito a motilidade total e ausente para motilidade progressiva, sugere um sistema bioenergético mais eficientemente regulado, no qual a progressão espermática parece menos dependente da abundância dessas subunidades. Adicionalmente, proteínas associadas à cadeia respiratória mitocondrial, às vias do metabolismo energético e ao controle do estresse oxidativo, como *COX6B2* ($r = 0.982^{**}$), *LDHA* ($r = 0.930^*$), *SOD2* ($r = 0.947^*$) e *PRDX5* ($r = 0.933^*$), correlacionaram-se positivamente com a motilidade progressiva, indicando que a eficiência metabólica e o equilíbrio redox estão associados ao desempenho espermático em touros de alta fertilidade. Em conjunto, os resultados indicam que, mesmo na ausência de alterações na motilidade espermática, diferenças funcionais no proteoma mitocondrial estão associadas ao desempenho espermático, refletindo distintos padrões de regulação bioenergética entre touros de alta e baixa fertilidade, nos quais a eficiência metabólica e o controle do estresse oxidativo podem influenciar a fertilidade.

Palavras-chave: fertilidade, sêmen, bovino, espectrometria de massas, bioenergética espermática.

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo CEUA da FMVZ-UNESP/Botucatu (protocolo n° 000.190.), seguindo as normas éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Agradecimentos e financiadores: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 200922/2022-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Limitations of sperm motility for detecting subfertility in bulls: insights from the mitochondrial proteome

Yasmin El Hayek Martins¹, Saurabh Tiwari², André Maciel Crespilho³, Paulina Betancur Guerra¹, Marcos Gomides Carvalho¹, John Patrick Kastelic², Jacob Chacko Thundathil², Angelo Gardim De Cesare⁴, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²University of Calgary, ³Central Bela Vista, ⁴Gestão e Monitoramento Agropecuário
E-mail: yasmin.hayek@unesp.br

Bull subfertility represents a diagnostic challenge in bovine reproduction, as sperm motility shows limited capacity to predict fertility, suggesting the presence of underlying molecular differences, including mitochondrial alterations. In this context, this study investigated the relationship between the mitochondrial proteome and sperm motility in high- and low-fertility bulls. Samples from 33 Nellore bulls, derived from 8,286 fixed-time artificial inseminations (FTAI), were classified based on pregnancy rates at 30 and 90 days (25th and 75th quartiles), resulting in the selection of high- (HF; n = 5; mean pregnancy rate = 60.6%) and low-fertility (LF; n = 6; mean pregnancy rate = 23.0%) groups, clearly distinguishing the groups. Semen samples, obtained from commercial straws previously approved according to semen quality standards established by breeding centers, were thawed, and total (TM) and progressive (PM) motility were evaluated using a computer-assisted sperm analysis system (CASA; IVOS I, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Mitochondria were isolated by differential centrifugation in a sucrose gradient and subjected to proteomic analysis (nLC-MS/MS, Orbitrap). Relative protein abundance was expressed as normalized emPAI values, considering, for each group, only proteins identified in at least 60% of samples, and correlated with motility parameters using Spearman's correlation, retaining only strong and significant associations ($r \geq 0.8$ or $r \leq -0.8$; $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**)). No differences were observed between HF and LF groups for TM and PM, indicating that conventional parameters do not adequately discriminate fertilizing potential and suggesting that other functional aspects may be involved. Distinct molecular patterns were observed between groups, particularly among subunits of respiratory chain complex I. In LF bulls, positive correlations with motility were observed, including PM: *NDUFA12* ($r = 0.943^*$), *NDUFB10* ($r = 1.000^{**}$), *NDUFS1* ($r = 0.943^*$) and TM: *NDUFV1* ($r = 0.886^*$) and *LDHA* ($r = 0.886^*$). In contrast, HF bulls exhibited predominantly negative correlations with total motility, including *NDUFB9* ($r = -0.925^*$), *NDUFC2* ($r = -0.955^*$) and *NDUFS1* ($r = -0.931^*$), along with positive correlations for *NDUFA7* ($r = 0.982^{**}$) and *NDUFV1* ($r = 0.999^{**}$). This pattern suggests differences in electron transport regulation and bioenergetic efficiency between groups. In LF bulls, the consistent association between complex I subunits and motility, including progressive motility, indicates greater energetic demand to sustain sperm movement, possibly reflecting a compensatory mechanism to maintain ATP production. In contrast, in HF bulls, the heterogeneous pattern of correlations, restricted to total motility and absent for progressive motility, suggests a more efficiently regulated bioenergetic system, in which sperm progression appears less dependent on the abundance of these subunits. Additionally, proteins associated with mitochondrial respiratory chain activity, energy metabolism pathways, and oxidative stress control, such as *COX6B2* ($r = 0.982^{**}$), *LDHA* ($r = 0.930^*$), *SOD2* ($r = 0.947^*$) and *PRDX5* ($r = 0.933^*$), were positively correlated with progressive motility, indicating that metabolic efficiency and redox balance are associated with sperm performance in high-fertility bulls. Overall, these findings indicate that, even in the absence of differences in sperm motility, functional variations in the mitochondrial proteome are associated with sperm performance, reflecting distinct patterns of bioenergetic regulation between high- and low-fertility bulls, in which metabolic efficiency and oxidative stress control may influence fertility.

Keywords: fertility, semen, bovine, mass spectrometry, sperm bioenergetics.

Legal authorizations: The study was approved by the CEUA of FMVZ-UNESP/Botucatu (protocol no. 000.190.), following the ethical standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Acknowledgments and funders: To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process 200922/2022-0), to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

MiR-449b associa-se a maior motilidade espermática em bubalinos

Raíssa Victória Ferraz Benzati¹, Fernanda Brambilla Martins¹, Pietro Sampaio Baruselli², Humberto Tonhati¹, Thais Rose dos Santos Hamilton¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: raissa.benzati@unesp.br

Durante décadas, o espermatozoide foi considerado uma célula cuja função primordial restringia-se à entrega do genoma paterno ao oócito. Entretanto, avanços na biologia molecular reprodutiva demonstram que essa célula transporta um conjunto complexo de componentes regulatórios capazes de influenciar eventos críticos da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Além do DNA, o espermatozoide fornece proteínas, padrões específicos de metilação do DNA, retenção seletiva de histonas e um repertório funcional de RNAs não codificadores, incluindo microRNAs (miRNAs), que participam da regulação pós-fecundação. Estudos recentes identificaram quatro miRNAs exclusivos em espermatozoides de touros com alta fertilidade na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Análises funcionais indicaram ação mais pronunciada do miR-449b, associado à modulação da expressão de enzimas envolvidas na remodelação da cromatina, especialmente relacionadas à desacetilação de histonas. Esse processo pode alterar o estado epigenético embrionário e promover aumento global da expressão gênica durante os estágios iniciais do desenvolvimento, acompanhando maiores taxas de clivagem e blastocistos em bovinos, e ainda, maior razão trofocotoderma:massa celular interna nos blastocistos. Apesar desses avanços na espécie bovina, permanece uma lacuna quanto à conservação e ao papel funcional desses miRNAs espermáticos em bubalinos (*Bubalus bubalis*), espécie de crescente importância econômica cuja eficiência reprodutiva ainda representa desafio para programas de produção *in vitro* de embriões. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença do miR-449b, descrito em touros com alta PIVE, em amostras de sêmen criopreservado bubalino com diferentes padrões de motilidade pós-descongelamento. Foram analisadas 24 amostras de sêmen bubalino criopreservado da raça Murrah. Duas palhetas por animal foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à motilidade (%) e vigor (escala de 0 a 5) por visualização em microscópio óptico (Primo Star, Zeiss), e integridade de membrana plasmática por coloração eosina-nigrosina (BotuVital, Botupharma). As amostras foram classificadas em dois grupos: Alta motilidade progressiva (>50%; média: 73,66±2,5 %; n=15) e Baixa motilidade progressiva (≤50%; média: 36,11±3,70 %; n=9). Após centrifugação em Percoll 30% para remoção do diluidor, miRNAs totais foram extraídos de 10 milhões de espermatozoides utilizando kit comercial (miRNeasy Mini Kit, Qiagen). O cDNA foi sintetizado com miRCURY LNA RT kit (Qiagen), seguido de quantificação relativa por PCR em tempo real (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific) do miR-449b (hsa-miR-449b-5p, YP00204751, Qiagen). Cts (*cycle threshold*) foram normalizados para expressão geométrica média dos níveis de miR-99b e miR-323 (hsa-miR-99b-5p, YP00205983; ssc-miR-383, YP02107961, Qiagen). Apenas amostras com valores de Ct menores que 37 foram considerados presentes. A análise estatística incluiu comparação entre grupos (alta X baixa motilidade), correlação (Pearson) no JASP (v.0.19.1), e a variação relativa da expressão do miR-449b foi calculada pelo método de -DDCt, gerando log₂FC (Fold Change). Observou-se maior vigor espermático no grupo alta comparado ao grupo baixa motilidade (3,66±0,18 vs 2,33±0,16; *p*<0,001), sem diferença para integridade de membrana plasmática. A expressão do miR-449b no grupo alta motilidade foi 3,36 vezes maior em relação ao grupo baixa motilidade (log₂(FC): 3,36±0,9; *p*=0,022). Adicionalmente, observou-se correlação positiva entre a expressão do miR-449b e a motilidade (rho=0,422; *p*=0,040) e o vigor espermático (rho=0,432; *p*=0,035). Esses resultados sugerem que maior motilidade espermática em bubalinos está associada ao aumento da expressão de miR-449b, indicando um possível papel deste miRNA no momento da fecundação no suporte ao desenvolvimento embrionário inicial.

Palavras-chave: microRNA, sêmen, epigenética, função espermática, desenvolvimento embrionário.

Autorizações legais: CEUA/FCAV UNESP: 9346545481/2025

Agradecimentos e financiadores: CNPq Universal # 404669/2023-9, PROPe UNESP (PIBIC RT), ABCB, Novagen

MiR-449b is associated with higher sperm motility in buffalo

Raíssa Victória Ferraz Benzati¹, Fernanda Brambilla Martins¹, Pietro Sampaio Baruselli², Humberto Tonhati¹, Thais Rose dos Santos Hamilton¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade de São Paulo
E-mail: raissa.benzati@unesp.br

For decades, the sperm was considered a cell whose primary function was limited to deliver the paternal genome to the oocyte. However, advances in reproductive molecular biology have demonstrated that this cell carries a complex set of regulatory components capable of influence critical events in fertilization and early embryo development. In addition to DNA, the sperm provides proteins, specific DNA methylation patterns, selective histone retention, and a functional repertoire of non-coding RNAs, including microRNAs (miRNAs), which participate in post-fertilization regulation. Recent studies have identified four exclusive miRNAs in sperm from bulls with high fertility in *in vitro* embryo production (IVEP). Functional analyses have indicated a more pronounced role of miR-449b, associated with the modulation of enzymes involved in chromatin remodeling related to histone deacetylation. This process may alter the embryo epigenetic state and promote a global increase in gene expression during early embryo developmental stages, generating higher cleavage and blastocyst rates in cattle, as well as an increased trophoctoderm: inner cell mass ratio in blastocysts. Despite these advances in bovine species, there remains a gap regarding the conservation and functional role of these sperm-derived miRNAs in buffalo (*Bubalus bubalis*), a specie of growing economic importance whose reproductive efficiency still represents a challenge for IVEP. Thus, the objective of this study was to evaluate the miR-449b expression, described in bulls with high IVEP, in cryopreserved buffalo semen samples with different post-thaw motility patterns. A total of 24 cryopreserved semen samples from Murrah buffalo were analyzed. Two straws per animal were thawed at 37°C for 30 seconds and evaluated for progressive motility (%) and vigor (scale 0–5) by light microscopy (Primo Star, Zeiss), as well as plasma membrane integrity using eosin-nigrosin staining (BotuVital, Botupharma). Samples were classified into two groups: high motility (progressive motility >50%; mean: 73.66±2.5%; n=15) and low motility (progressive motility ≤50%; mean: 36.11±3.70%; n=9). After centrifugation in 30% Percoll to remove the extender, total miRNAs were extracted from 10 million sperma using a commercial kit (miRNeasy Mini Kit, Qiagen). cDNA was synthesized using the miRCURY LNA RT kit (Qiagen), followed by qPCR of miR-449b (hsa-miR-449b-5p, YP00204751, Qiagen; QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific). Ct (cycle threshold) values were normalized to the geometric mean expression of miR-99b and miR-323 (hsa-miR-99b-5p, YP00205983; ssc-miR-383, YP02107961, Qiagen). Only samples with Ct values below 37 were considered positive. Statistical analysis included group comparisons (high vs. low motility), Pearson correlation using JASP (v.0.19.1), and relative expression of miR-449b was calculated by the $-\Delta\Delta C_t$ method, generating log₂ fold change (log₂FC). Higher sperm vigor was observed in high motility compared to the low motility group (3.66±0.18 vs. 2.33±0.16; $p < 0.001$), with no difference in plasma membrane integrity. miR-449b expression in high motility group was 3.36-fold higher than the low motility group (log₂FC: 3.36±0.9; $p = 0.022$). Additionally, a positive correlation was observed between miR-449b expression and motility ($\rho = 0.422$; $p = 0.040$) as well as sperm vigor ($\rho = 0.432$; $p = 0.035$). These results indicate that higher sperm motility in buffalo is associated with increased miR-449b expression, indicating a potential role for this miRNA at fertilization in supporting early embryo development.

Keywords: microRNA, semen, epigenetics, sperm function, embryo development.

Legal authorizations: CEUA/FCAV UNESP: 9346545481/2025

Acknowledgments and funders: CNPq Universal # 404669/2023-9, PROPe UNESP (PIBIC RT), ABCB, Novagen

Monitoramento da contaminação bacteriana em sêmen bovino: uma análise retrospectiva de cinco anos

Sofia Regina Polizelle¹, Gilson Antônio Pessoa², Pedro Nacib Jorge-Neto³, Ricardo Zanella¹

¹Universidade de Passo Fundo, ²Universidade Federal de Santa Maria, ³Universidade de São Paulo
E-mail: spolizelle@gmail.com

A expansão do melhoramento genético elevou a produção anual a patamares superiores a 23 milhões de doses em 2025, tornando o rigoroso controle de qualidade em Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) imperativo para a eficiência reprodutiva nacional. Apesar do impacto deletério da contaminação sobre a viabilidade espermática e as taxas de prenhez, a padronização microbiológica para o sêmen industrializado ainda não está consolidada, dada a inexistência de limites numéricos de aceitação normatizados. Ressalta-se que, embora a água para preparo de diluentes siga padrões rigorosos de pureza (ASTM D1193-24 Tipo I ou II, Grau A; HBC \leq 0,01 UFC/mL), inexistem limites oficiais de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) para a microbiota geral no sêmen (ejaculado e dose comercial), tanto no MAPA quanto na NAAB/CSS. Este estudo teve como objetivo avaliar a carga bacteriana, caracterizar o perfil microbiológico e identificar fatores determinantes da contaminação em sêmen bovino ao longo de um quinquênio. Foram analisadas 2.596 partidas de sêmen provenientes de três CCPS. As amostras foram submetidas ao cultivo em ágar sangue via plaqueamento em superfície (alça de Drigalsky), com incubação a 37 °C por 72 horas e quantificação de UFC/mL em intervalos de 24, 48 e 72 horas. A identificação taxonômica fundamentou-se em métodos convencionais (Gram, catalase e oxidase) e provas bioquímicas direcionadas (TSI, SIM, GOF, urease, esculina e citrato), complementadas pelo sistema comercial Bactray (Laborclin). Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva e modelo linear generalizado misto (GLMM), considerando ano e central como efeitos fixos, e touro e partida como efeitos aleatórios. A prevalência média de contaminação foi de 56,6%, com variação interanual significativa ($p < 0,0001$). Observou-se um incremento substancial na ocorrência de contaminação entre 2020 (22,2% \pm 1,0) e 2021 (75,4% \pm 0,6), mantendo-se elevada em 2022 (73,7% \pm 0,3), seguido por uma tendência de redução progressiva em 2023 (65,7% \pm 0,18), 2024 (53,7% \pm 0,17) e 2025 (49,1% \pm 0,17), permanecendo em níveis ainda expressivos. Houve efeito significativo entre centrais ($p < 0,0001$), com frequências variando de 30,1% \pm 0,4 a 80,3% \pm 0,1 e probabilidades preditas entre 0,17 e 0,80. As disparidades de risco entre estabelecimentos chegaram a 20 vezes, evidenciando forte influência de fatores operacionais. A análise microbiológica revelou predominância de microrganismos ambientais, notadamente *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas spp.* e o complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, sugerindo fontes de contaminação associadas à água, equipamentos e formação de biofilmes. Adicionalmente, a variabilidade associada às partidas superou a observada entre touros, indicando que a contaminação está primordialmente relacionada aos processos de colheita e processamento, e não a fatores individuais dos animais. Os resultados demonstram elevada variabilidade espaço-temporal na contaminação bacteriana em sêmen bovino, reforçando o papel crítico das condições operacionais e dos protocolos de higiene. Esses achados reiteram a necessidade de monitoramento contínuo e da padronização de práticas sanitárias para a mitigação da contaminação e otimização da eficiência reprodutiva.

Palavras-chave: controle de qualidade, biossegurança, processamento de sêmen, microbiologia reprodutiva.

Agradecimentos e financiadores: CAPES – Código de Financiamento 001, Projeto MAI/DAI (Processo nº 141961/2025-2), empresas IMV Technologies Brasil e Zebu Fértil.

Monitoring bacterial contamination in bovine semen: a five-year retrospective analysis

Sofia Regina Polizelle¹, Gilson Antônio Pessoa², Pedro Nacib Jorge-Neto³, Ricardo Zanella¹

¹Universidade de Passo Fundo, ²Universidade Federal de Santa Maria, ³Universidade de São Paulo
E-mail: spolizelle@gmail.com

The expansion of genetic improvement has increased annual production to over 23 million doses in 2025, making rigorous quality control in Bull Semen Collection Centers (BSCC) imperative for national reproductive efficiency. Despite the deleterious impact of bacterial contamination on sperm viability and pregnancy rates, standardization of microbiological criteria for processed semen is not yet established. Notably, while water for extender preparation follows strict purity standards (ASTM D1193-24 Type I or II, Grade A; HBC ≤ 0.01 CFU/mL), official colony-forming unit (CFU/mL) limits for general microbiota in semen (ejaculate and commercial dose) are absent from both MAPA and NAAB/CSS regulations. This study aimed to evaluate the bacterial load, characterize the microbiological profile, and identify determining factors of contamination in bovine semen over a five-year period. A total of 2,596 semen batches from three (BSCC) were analyzed. Samples were cultured on blood agar using the surface spread technique (Drigalsky spatula), with incubation at 37 °C for 72 hours and CFU/mL quantified at 24, 48, and 72-hour intervals. Taxonomic identification was based on conventional methods (Gram staining, catalase, and oxidase) and targeted biochemical tests (TSI, SIM, GOF, urease, esculin, and citrate), complemented by the Bactray (Laborclin) commercial system. Data were analyzed using descriptive statistics and a Generalized Linear Mixed Model (GLMM), considering year and center as fixed effects, and bull and batch as random effects. The mean contamination prevalence was 56.6%, with significant interannual variation ($p < 0.0001$). A substantial increase in contamination occurred between 2020 (22.2% ± 1.0) and 2021 (75.4% ± 0.6), remaining high in 2022 (73.7% ± 0.3). This was followed by a progressive reduction in 2023 (65.7% ± 0.18), 2024 (53.7% ± 0.17), and 2025 (49.1% ± 0.17), although levels remained expressive. A significant effect was observed between centers ($p < 0.0001$), with frequencies ranging from 30.1% ± 0.4 to 80.3% ± 0.1 and predicted probabilities between 0.17 and 0.80. Risk disparities reached up to 20-fold between facilities, highlighting the strong influence of operational factors. Microbiological analysis revealed a predominance of environmental microorganisms, notably *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas spp.*, and the *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex*, suggesting contamination sources related to water, equipment, and biofilm formation. Additionally, variability associated with batches exceeded that observed among bulls, indicating that contamination is primarily related to collection and processing rather than individual animal factors. The results demonstrate high spatiotemporal variability in bovine semen bacterial contamination, reinforcing the critical role of operational conditions and hygiene protocols. These findings reiterate the need for continuous monitoring and standardized sanitary practices to mitigate contamination and optimize reproductive efficiency.

Keywords: reproductive microbiology, quality control, biosecurity, semen processing.

Legal authorizations: no applicable.

Acknowledgments and funders: CAPES – Finance Code 001, MAI/DAI project (Process No. 141961/2025-2), IMV Technologies Brazil and Zebu Fétil.

Padrões de testosterona em touros *Bos indicus* e compostos: evidências de divergência aos 18 meses

Grazielli Rigo Simões^{1,2}, Rubens Paes de Arruda³, Giovanna Galhardo Ramos^{4,2}, Joedson Dantas Gonçalves^{4,2}, Bruna Eduarda Moreira Feio Falcão^{4,2}, Alexandre Rossetto Garcia^{4,2}

¹Centro Universitário Central Paulista, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ⁴Universidade Federal do Pará
E-mail: grazzy.rs005@gmail.com

A testosterona desempenha um papel crucial na regulação da espermatogênese e na função testicular. Os níveis séricos circulantes de testosterona podem fornecer um panorama geral do desenvolvimento reprodutivo do touro, visto que altas concentrações desse hormônio indicam maior maturidade sexual. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar o perfil sérico de testosterona de touros jovens zebuínos (Nelore) e compostos (Canchim) em diferentes idades do desenvolvimento reprodutivo. Foram utilizados touros jovens das raças Nelore (*Bos indicus*; n = 22) e Canchim (*Bos indicus* x *Bos taurus*; n = 24) mantidos em pastejo rotacionado intensivo (24 ha de *Urochloa brizantha* cv. Piatã) com acesso *ad libitum* à mistura mineral e água. Os animais Nelore e Canchim iniciaram o estudo após a desmama, com 206,4±4,2 e 228,9±8,6 kg, e com 7,6±0,1 e 8,9±0,1 meses. Os animais foram avaliados durante 12 meses consecutivos, período no qual foram realizadas mensalmente coletas de sangue, por venopunção jugular em horário predefinido (8h00-10h00). O sangue foi coletado em tubos de 10 mL siliconizados a vácuo, sem anticoagulante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1350×g por 15 min para separação do soro, que foi fracionado em alíquotas e armazenado em microtubos de polipropileno a -20°C. As concentrações séricas de testosterona foram determinadas por radioimunoensaio utilizando kit comercial Immuchem™ Testosterone Double Antibody (MP Biomedicals, Diagnostics Division, EUA), com sensibilidade do ensaio de 0,08 ng/mL e coeficiente de variação intraensaio de 7%. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA em modelo misto, seguida do teste de Tukey (P<0,05) no software R (R Core Team, 2023). Foram avaliados os efeitos de raça (Nelore e Canchim) dentro das idades (8, 10, 12, 14, 16 e 18 meses). Não foram observadas diferenças na concentração de testosterona sérica entre os animais Nelore e Canchim aos 8 meses de idade (0,37±0,07 vs 0,61±0,13 ng/mL; P = 0,13), aos 10 meses (0,89±0,14 vs 0,94±0,32 ng/mL; P = 0,90), aos 12 meses (1,81±0,36 vs 2,15±0,58 ng/mL; P = 0,63), aos 14 meses (1,73±0,31 vs 1,23±0,25 ng/mL; P = 0,21) e aos 16 meses (1,62±0,33 vs 1,94±0,36 ng/mL; P = 0,51), respectivamente. Entretanto, aos 18 meses foi observado que os animais da raça Nelore demonstraram maior concentração sérica de testosterona em relação aos animais Canchim (3,14±0,48a vs 1,53±0,31b ng/mL; P = 0,006). Do mesmo modo, Barbosa et al. (1992) reportaram que os animais Nelore apresentaram níveis mais elevados de testosterona comparativamente a animais Canchim, ainda que havendo idade mais avançada (27 e 39 meses). Contudo, Romanello et al. (2024) observaram que touros da raça Canchim apresentaram concentrações mais elevadas de testosterona que animais Nelore, dos 27 aos 40 meses de idade. No presente estudo, os animais das raças Nelore e Canchim apresentaram perfis de testosterona semelhantes, com divergência observada somente aos 18 meses de idade, o que pode representar um ponto de inflexão e diferenciação no processo de amadurecimento sexual. O reduzido número de estudos de fisiologia comparada em touros jovens de diferentes raças ainda limita inferências mais robustas sobre os resultados. Isso indica que a análise comparativa da concentração sérica de testosterona em bovinos jovens deve ser mais explorada, visto que essa característica está intrinsecamente relacionada a respostas relacionadas ao desenvolvimento e ao desempenho reprodutivo do animal, e é de grande interesse para seleção de touros sexualmente precoces. Com base nos resultados, conclui-se que, sob as condições adotadas, touros jovens Nelore e Canchim apresentaram perfil semelhante de testosterona do desmame aos 16 meses de idade, com elevação mais expressiva nos animais zebuínos aos 18 meses de idade.

Palavras-chave: andrologia animal, hormônio reprodutivo, genótipos, bovinos.

Autorizações legais: EMBRAPA (CEUA PRT 02/2023); USP (CEUAX 6157180523).

Agradecimentos e financiadores: FAPESP (Processo 2021/04335-3); CNPq (Processos 312295/2022-7, 137738/2025-0, 402044/2025-8) e CAPES.

Testosterone levels in *Bos indicus* and crossbred bulls: evidence of divergence at 18 months

Grazielli Rigo Simões^{1,2}, Rubens Paes de Arruda³, Giovanna Galhardo Ramos^{4,2}, Joedson Dantas Gonçalves^{4,2}, Bruna Eduarda Moreira Feio Falcão^{4,2}, Alexandre Rossetto Garcia^{4,2}

¹Centro Universitário Central Paulista, ²Embrapa Pecuária Sudeste, ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ⁴Universidade Federal do Pará
 E-mail: grazzy.rs005@gmail.com

Testosterone plays a crucial role in regulating spermatogenesis and testicular function. Circulating serum testosterone levels can provide an overview of a bull's reproductive development, as high concentrations of this hormone indicate greater sexual maturity. Thus, the objective of this study was to evaluate the serum testosterone profile of young Zebu (Nelore) and crossbreed (Canchim) bulls at different stages of reproductive development. Young bulls of the Nelore (*Bos indicus*; n = 22) and Canchim (*Bos indicus* × *Bos taurus*; n = 24) breeds were used. The animals were raised under an intensive rotational grazing system (24 ha of *Urochloa brizantha* cv. Piatã) with *ad libitum* access to a mineral mix and water. The Nelore and Canchim bulls entered the study after weaning, weighing 206.4±4.2 and 228.9±8.6 kg, and at 7.6±0.1 and 8.9±0.1 months of age. The animals were monitored for 12 consecutive months, during which blood samples were collected monthly, via jugular venipuncture at a predetermined time (8:00-10:00 a.m.). Blood was collected in 10-mL vacuum-sealed, silicone-coated tubes without anticoagulant. The samples were centrifuged at 1350×g for 15 minutes to separate the serum, which was divided into aliquots and stored in polypropylene microtubes at -20°C. Serum testosterone concentrations were determined by radioimmunoassay using the commercial ImmuChem™ Testosterone Double Antibody kit (MP Biomedicals, Diagnostics Division, USA), with an assay sensitivity of 0.08 ng/mL and an intra-assay coefficient of variation of 7%. Statistical analyses were performed using mixed-model ANOVA, followed by Tukey's test (P < 0.05), using the R software (R Core Team, 2023). The effect of breed (Nelore and Canchim) was evaluated across different ages (8, 10, 12, 14, 16, and 18 months). No differences were observed in serum testosterone concentrations between Nelore and Canchim bulls at 8 months of age (0.37±0.07 vs. 0.61±0.13 ng/mL; P = 0.13), at 10 months (0.89±0.14 vs. 0.94±0.32 ng/mL; P = 0.90), at 12 months (1.81±0.36 vs. 2.15±0.58 ng/mL; P = 0.63), at 14 months (1.73±0.31 vs. 1.23±0.25 ng/mL; P = 0.21), and at 16 months (1.62±0.33 vs. 1.94±0.36 ng/mL; P = 0.51), respectively. However, at 18 months, Nelore cattle were found to have higher serum testosterone concentrations than Canchim cattle (3.14±0.48a vs. 1.53±0.31b ng/mL; P = 0.006). Similarly, Barbosa et al. (1992) reported that Nelore cattle had higher testosterone levels than Canchim cattle, even though they were older (27 and 39 months). Nonetheless, Romanello et al. (2024) observed that Canchim bulls had higher testosterone concentrations than Nelore bulls between 27 and 40 months of age. In the present study, Nelore and Canchim cattle exhibited similar testosterone profiles, with differences observed only at 18 months of age, which may represent a turning point and a time point of differentiation in the process of sexual maturation. The limited number of comparative physiology studies on young bulls of different breeds still prevents more robust inferences from being drawn about the results. This suggests that comparative analysis of serum testosterone concentrations in young cattle should be further explored, given that this trait is intrinsically linked to responses related to the animal's development and reproductive performance and is of great interest for the selection of sexually precocious bulls. Based on the results, it can be concluded that, under the conditions used, young Nelore and Canchim bulls exhibited similar testosterone profiles from weaning to 16 months of age, with a more pronounced increase in Zebu cattle at 18 months of age.

Keywords: veterinary andrology, reproductive hormones, genotypes, cattle.

Legal authorizations: EMBRAPA (CEUA PRT 02/2023); USP (CEUAX 6157180523).

Acknowledgments and funders: FAPESP (Processo 2021/04335-3); CNPq (Processos 312295/2022-7, 137738/2025-0, 402044/2025-8) e CAPES.

Perfil metabolômico neonatal e precocidade sexual em touros Nelore: identificação de potenciais biomarcadores

Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ana Laura Pasqualinotto², Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Laura Nataly Garcia Oliveros², Nara Regina Brandão Consolo¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade de São Paulo
E-mail: fernandabaatsch@usp.br

A precocidade sexual em touros representa uma característica de grande interesse para os sistemas de produção, porém seu diagnóstico, baseado na idade à puberdade, ocorre apenas no início da vida reprodutiva, limitando a seleção precoce de reprodutores. Nesse contexto, a metabolômica surge como uma ferramenta promissora para identificação de biomarcadores associados ao desenvolvimento reprodutivo. Assim, objetivou-se investigar a relação entre o perfil metabolômico sérico neonatal e a precocidade sexual em touros Nelore. Foram utilizados 109 animais, submetidos à coleta de sangue ao nascimento e avaliação seminal mensal dos 10 aos 17 meses de idade. O soro foi analisado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O sêmen foi avaliado quanto à motilidade (%), vigor (escala 0–5) e concentração ($\times 10^6$ spz/mL), sendo a puberdade definida como ejaculado com pelo menos 50×10^6 espermatozoides totais e $\geq 10\%$ de motilidade. A partir da idade à puberdade, os animais foram classificados em superprecoces (10–14 meses) e precoces (15–17 meses). A qualidade seminal foi comparada no momento da puberdade (D0) e dois meses após (D2), representando o início da maturação espermática. As comparações entre grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon e as associações entre metabólitos e parâmetros seminais por correlação de Spearman. Análises multivariadas foram conduzidas por PLS-DA, com cálculo de VIP score, além de heatmaps para explorar as associações metabólicas. A idade à puberdade diferiu significativamente entre os grupos ($p < 0,0001$), sendo menor nos superprecoces ($12,8 \pm 0,9$ meses) em comparação aos precoces ($15,5 \pm 0,8$ meses), com diferença média de 2,7 meses. No D0, os superprecoces apresentaram maior concentração espermática ($44,2 \pm 48,7 \times 10^6$ spz/mL) em relação aos precoces ($23,7 \pm 21,3 \times 10^6$ spz/mL; $P = 0,002$), enquanto motilidade e vigor não diferiram ($P > 0,05$). No D2, não foram observadas diferenças entre os grupos para nenhuma das características seminais ($P > 0,05$). A metabolômica revelou associações significativas entre metabólitos e parâmetros seminais. No D0, houve correlação negativa entre propionato e concentração espermática ($r = -0,26$; $P = 0,006$), bem como entre betaína ($r = -0,19$; $P = 0,043$) e creatinina ($r = -0,19$; $P = 0,046$) com a motilidade, enquanto lisina correlacionou-se positivamente com o vigor ($r = 0,19$; $P = 0,044$). No D2, a concentração espermática apresentou correlação positiva com frutose ($r = 0,30$; $P = 0,019$) e negativa com lactato ($r = -0,26$; $P = 0,038$), enquanto a motilidade apresentou correlação negativa com creatina-fosfato ($r = -0,28$; $P = 0,025$) e lactato ($r = -0,25$; $P = 0,046$) e positiva com valina ($r = 0,25$; $P = 0,02$). As análises multivariadas indicaram que metabólitos relacionados ao metabolismo energético, incluindo piruvato, frutose, manose e hidroxibutirato, apresentaram valores elevados de VIP score, contribuindo significativamente para a separação metabólica entre os grupos. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético e de aminoácidos associaram-se a parâmetros seminais no início da vida reprodutiva. Conclui-se que touros Nelore superprecoces apresentam antecipação da puberdade e maior concentração espermática no seu estabelecimento, associadas a diferenças no perfil metabolômico neonatal. Metabólitos energéticos, como piruvato, frutose, manose e hidroxibutirato, possivelmente refletem maior disponibilidade energética, favorecendo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e antecipando a função testicular, destacando-se como potenciais biomarcadores da precocidade sexual e do desenvolvimento reprodutivo.

Palavras-chave: precocidade sexual, biomarcadores, metabolômica, qualidade seminal, Nelore.

Autorizações legais: CEUA/FZEA-USP: protocolo n. 9249180123 e CEUA/FMVZ-USP n. 265190525

Agradecimentos e financiadores: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2023/01059-0) pelo apoio financeiro

Neonatal metabolomic profile and sexual precocity in Nelore bulls: identification of potential biomarkers

Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ana Laura Pasqualinotto², Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Laura Nataly Garcia Oliveros², Nara Regina Brandão Consolo¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade de São Paulo
E-mail: fernandabaatsch@usp.br

Sexual precocity in bulls represents a trait of great interest for production systems; however, its diagnosis, based on age at puberty, occurs only at the onset of reproductive life, limiting early selection of breeders. In this context, metabolomics emerges as a promising tool for identifying biomarkers associated with reproductive development. Thus, this study aimed to investigate the relationship between neonatal serum metabolomic profile and sexual precocity in Nelore bulls. A total of 109 animals were used, subjected to blood collection at birth and monthly semen evaluation from 10 to 17 months of age. Serum was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Semen was evaluated for motility (%), vigor (scale 0–5), and concentration ($\times 10^6$ sperm/mL), and puberty was defined as an ejaculate containing at least 50×10^6 total spermatozoa and $\geq 10\%$ motility. Based on age at puberty, animals were classified as super-precocious (10–14 months) or precocious (15–17 months). Seminal quality was compared at the time of puberty (D0) and two months later (D2), representing the initial stage of sperm maturation. Group comparisons were performed using the Wilcoxon test, and associations between metabolites and seminal parameters were assessed by Spearman correlation. Multivariate analyses were conducted using Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), with calculation of Variable Importance in Projection (VIP) scores, and heatmaps were used to explore metabolic associations. Age at puberty differed significantly between groups ($p < 0.0001$), being lower in super-precocious bulls (12.8 ± 0.9 months) compared to precocious bulls (15.5 ± 0.8 months), with an average difference of 2.7 months. At D0, super-precocious bulls showed higher sperm concentration ($44.2 \pm 48.7 \times 10^6$ sperm/mL) than precocious bulls ($23.7 \pm 21.3 \times 10^6$ sperm/mL; $P = 0.002$), while motility and vigor did not differ ($P > 0.05$). At D2, no differences were observed between groups for any seminal traits ($P > 0.05$). Metabolomics revealed significant associations between metabolites and seminal parameters. At D0, a negative correlation was observed between propionate and sperm concentration ($r = -0.26$; $P = 0.006$), as well as between betaine ($r = -0.19$; $P = 0.043$) and creatinine ($r = -0.19$; $P = 0.046$) with motility, whereas lysine showed a positive correlation with vigor ($r = 0.19$; $P = 0.044$). At D2, sperm concentration showed a positive correlation with fructose ($r = 0.30$; $P = 0.019$) and a negative correlation with lactate ($r = -0.26$; $P = 0.038$), while motility was negatively correlated with creatine phosphate ($r = -0.28$; $P = 0.025$) and lactate ($r = -0.25$; $P = 0.046$), and positively correlated with valine ($r = 0.25$; $P = 0.02$). Multivariate analyses indicated that metabolites related to energy metabolism, including pyruvate, fructose, mannose, and hydroxybutyrate, showed high VIP scores, contributing significantly to metabolic separation between groups. Metabolites related to energy and amino acid metabolism were associated with seminal parameters at the onset of reproductive life. It is concluded that super-precocious Nelore bulls exhibit earlier onset of puberty and higher sperm concentration at its establishment, associated with differences in the neonatal metabolomic profile. Energy-related metabolites, such as pyruvate, fructose, mannose, and hydroxybutyrate, may reflect greater energy availability, favoring the activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and anticipating testicular function, highlighting their potential as biomarkers of sexual precocity and reproductive development.

Keywords: sexual precocity, biomarkers, metabolomics, seminal quality, Nelore.

Legal authorizations: CEUA/FZEA-USP: protocol no. 9249180123 and CEUA/FMVZ-USP n. 5265190525

Acknowledgments and funders: The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP, n° 2023/01059-0), for financial support.

Perfil morfológico de espermatozoides de búfalos (*Bubalus bubalis*) submetidos a exame andrológico

Aluizio Otávio Almeida da Silva^{1,2}, Alysson Jorge de Oliveira Sousa³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Helbilena Gildeli Rodrigues Vasconcelos¹, Welligton Conceição da Silva⁵, Beatriz Lima Guerreiro¹, Katarina Cardoso de Carvalho², Sávio Lins Pimentel¹, Lilian Kátia Ximenes Silva^{1,2}, José Silva de Sousa¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Universidade Federal Rural da Amazônia, ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, ⁴Embrapa Pecuária Sudeste, ⁵Universidade da Amazônia
E-mail: otavio@ufpa.br

O exame andrológico representa uma importante estratégia para a seleção de touros aptos a reprodução, sejam destinados a monta natural ou a coleta de sêmen para uso em biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial e a produção *in vitro* de embriões. Na rotina do exame andrológico tem-se a avaliação da morfologia espermática que fornece o percentual de normalidade do ejaculado, sendo que esta pode refletir problemas de infertilidade e/ou subfertilidade. Ressalta-se que na maioria das vezes, touros bubalinos apresentam produção espermática contínua e uniforme ao longo de sua vida reprodutiva, inclusive com mantendo a qualidade e normalidade seminal. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o perfil morfológico de espermatozoides de búfalos (*Bubalus bubalis*) submetidos a exame andrológico. Noventa e um (91) machos bubalinos adultos (20 a 42 meses) distribuídos em diferentes propriedades do Estado do Pará e na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), localizada no município de Castanhal/PA (01° 17'38" S; 47°55'35" W), foram submetidos a avaliação andrológica. Após a coleta de sêmen pelo método da vagina artificial, alíquotas de 40 µL foram diluídas em microtubos contendo 1000 µL de solução de formalina tamponada para a avaliação da morfologia espermática em microscopia de contraste de fase (1000X), sendo contadas 100 células por amostra e o resultado expresso em porcentagem (%). Para a determinação da morfologia espermática foi adotado o seguinte critério de classificação: defeitos espermáticos maiores (DMA; %), que referem-se as anormalidades correlacionadas com maiores prejuízos na fertilidade ou com patologias testiculares ou epididimárias; defeitos espermáticos menores (DME; %), que relacionam-se a falhas durante o processamento do sêmen e são considerados de menor impacto na fertilidade; e, defeitos espermáticos totais (DT; %) (Bloom, 1973). Durante o estudo foram detectadas taxas de 83,26% de espermatozoides morfolologicamente normais e 16,74% de defeitos espermáticos, sendo que 8,47% foram classificados como DMA e 8,27% como DME. Sabe-se que uma amostra de sêmen bubalino para ser considerada apta deve obrigatoriamente apresentar um percentual de espermatozoides morfolologicamente normais não inferior a 70%, o que foi observado em todas as análises realizadas no presente estudo, estando os animais a campo ou exclusivamente em baias. Em relação a detecção das alterações morfológicas, são aceitáveis níveis de até 10% de DMA e 20% de DME, ressaltando-se que em nenhuma avaliação foram ultrapassados esses limites. Dentre os defeitos espermáticos maiores encontrados destacam-se: cauda fortemente dobrada (3,26%), gota citoplasmática proximal (1,60%) e cauda dobrada/enrolada com gota (1,20%). As alterações encontradas nas caudas, como a fortemente dobrada e a dobrada/enrolada com gota, surgem durante a passagem pelo epidídimo e em casos de degeneração testicular ou imaturidade sexual. A presença constante da gota citoplasmática proximal pode indicar disfunção epididimária, assim como imaturidade sexual, sendo que níveis maiores que 5% associam-se a redução da fertilidade. A cauda dobrada/enrolada (5,82%) e a cabeça isolada normal (1,71%) foram os defeitos menores mais observados. A cauda dobrada/enrolada relaciona-se ao choque térmico, sendo de extrema necessidade o cuidado com as amostras de sêmen bubalino, devido sua alta sensibilidade a variações térmicas, devendo-se evitar a fixação do sêmen em formol frio ou o uso de lâminas não aquecidas. Aumento da porcentagem de cabeças isoladas normais é quase sempre um evento transitório associado a condições inflamatórias nos testículos, glândulas acessórias ou ducto epididimário, assim como a processos degenerativos testiculares. Conclui-se que os bubalinos mesmo mantidos em diferentes sistemas de manejos (a pasto ou em baias) são capazes de manter o padrão de normalidade morfológica espermática, demonstrando alta adaptabilidade sob as condições do bioma amazônico.

Palavras-chave: andrologia animal, defeitos espermáticos, patologias reprodutivas, bubalinocultura.

Autorizações legais: Não aplicável.

Morphological profile of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa submitted to andrological examination in the Brazilian Amazon

Aluizio Otávio Almeida da Silva^{1,2}, Alysson Jorge de Oliveira Sousa³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Helbilena Gildeli Rodrigues Vasconcelos¹, Welligton Conceição da Silva⁵, Beatriz Lima Guerreiro¹, Katarina Cardoso de Carvalho², Sávio Lins Pimentel¹, Lilian Kátia Ximenes Silva^{1,2}, José Silva de Sousa¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Universidade Federal Rural da Amazônia, ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, ⁴Embrapa Pecuária Sudeste, ⁵Universidade da Amazônia
E-mail: otavio@ufpa.br

Andrological examination represents an important strategy for the selection of bulls fit for reproduction, whether intended for natural mating or semen collection for use in reproductive biotechnologies such as artificial insemination and in vitro embryo production. In the routine of andrological examination, sperm morphology assessment provides the percentage of ejaculate normality, which may reflect infertility and/or subfertility problems. It is noteworthy that, in most cases, buffalo bulls present continuous and uniform sperm production throughout their reproductive life, including the maintenance of seminal quality and normality. In this context, the objective was to evaluate the morphological profile of spermatozoa from buffaloes (*Bubalus bubalis*) subjected to andrological examination. Ninety-one (91) adult male buffaloes (20 to 42 months old), distributed across different farms in the State of Pará and at the Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), located in the municipality of Castanhal, Pará, Brazil (01° 17'38" S; 47°55'35" W), were subjected to andrological evaluation. After semen collection by the artificial vagina method, 40 µL aliquots were diluted in microtubes containing 1000 µL of buffered formalin solution for sperm morphology evaluation under phase-contrast microscopy (1000X), with 100 cells counted per sample and the result expressed as percentage (%). For the determination of sperm morphology, the following classification criterion was adopted: major defects (MAD; %), which refer to abnormalities correlated with greater impairment of fertility or with testicular or epididymal pathologies; minor defects (MID; %), which are related to failures during semen processing and are considered to have less impact on fertility; and total defects (TD; %) (Bloom, 1973). During the study, rates of 83.26% morphologically normal spermatozoa and 16.74% sperm defects were detected, with 8.47% classified as MAD and 8.27% as MID. It is known that, for a buffalo semen sample to be considered suitable, it must necessarily present a percentage of morphologically normal spermatozoa not lower than 70%, which was observed in all analyses carried out in the present study, whether the animals were raised in the field or exclusively in stalls. Regarding the detection of morphological alterations, levels of up to 10% MAD and 20% MID are considered acceptable, and in none of the evaluations were these limits exceeded. Among the major sperm defects found, the following stood out: strongly bent tail (3.26%), proximal cytoplasmic droplet (1.60%), and bent/coiled tail with droplet (1.20%). Alterations found in the tails, such as strongly bent tail and bent/coiled tail with droplet, arise during passage through the epididymis and in cases of testicular degeneration or sexual immaturity. The constant presence of proximal cytoplasmic droplet may indicate epididymal dysfunction, as well as sexual immaturity, and levels greater than 5% are associated with reduced fertility. Bent/coiled tail (5.82%) and normal detached head (1.71%) were the most frequently observed minor defects. Bent/coiled tail is related to thermal shock, making careful handling of buffalo semen samples extremely necessary due to their high sensitivity to temperature variations, and fixation of semen in cold formalin or the use of non-heated slides should be avoided. An increase in the percentage of normal detached heads is almost always a transient event associated with inflammatory conditions in the testes, accessory glands, or epididymal duct, as well as with testicular degenerative processes. It is concluded that buffaloes, even when maintained under different management systems (pasture or stalls), are able to maintain the pattern of sperm morphological normality, demonstrating high adaptability under the conditions of the Amazon biome.

Keywords: animal andrology, sperm defects, reproductive pathologies, buffalo production.

Legal authorizations: Not applicable

Perímetro escrotal e afecções em touros das raças Brangus e Braford

Gilson Antônio Pessoa¹, Ana Paula Martini¹, Isadora Teixeira Souto¹, Emanuelli Zanon Gobbi¹, Emídio Ferreira Machado Filho²

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²Reprobiovet Consultoria
E-mail: gilson.pessoa@ufsm.br

O perímetro escrotal (PE) é um dos principais indicadores do potencial reprodutivo em touros, refletindo diretamente o desenvolvimento testicular. Este estudo observacional foi conduzido em um criatório de genética das raças Brangus e Braford, localizado na fronteira oeste do Rio Grande do Sul, ao longo de quatro anos (2021–2025), avaliando touros aos 24 meses de idade. Foram submetidos ao exame andrológico 407 animais das raças Brangus (n=202) e Braford (n=205), pertencentes a grupos contemporâneos. A análise estatística foi realizada no SAS OnDemand, utilizando modelo linear. A taxa geral de inaptidão reprodutiva foi de 24,3% (99/407), sem diferença entre as raças (Braford: 24,4%, 50/407; Brangus: 24,2%, 49/202; P=0,72). A principal causa de descarte foi a falha no exame de comportamento sexual, responsável por 13,5% (55/407) dos casos, não diferindo entre os grupos genéticos. Observou-se efeito significativo da raça sobre o PE (P<0,001), sendo maior nos touros Brangus (39,5 ± 1,5 cm) em comparação aos Braford (35,6 ± 2,2 cm), considerando apenas animais aptos. Houve aumento progressivo do PE ao longo dos anos (P=0,0001), passando de 34,8 ± 1,3 cm em 2021 para 37,8 ± 1,4 cm em 2025. A prevalência de hipoplasia testicular foi similar entre as raças (Brangus: 4,9%; Braford: 5,3%; P>0,05). Entretanto, essa condição teve efeito significativo sobre o PE (P<0,001), com redução acentuada nos animais acometidos (29,4 ± 2,5 cm) em comparação aos normais (36,8 ± 1,8 cm), confirmando seu impacto sobre o desenvolvimento gonadal. A vesiculite seminal apresentou maior ocorrência na raça Braford (12,5%, 26/207) em relação à Brangus (3,9%, 15/203) (P=0,001). Adicionalmente, touros Brangus apresentaram melhor qualidade seminal, com maior motilidade (86 ± 5,2% vs. 79 ± 2,2%; P=0,001) e maior percentual de espermatozoides normais (81 ± 4% vs. 74 ± 3,2%; P=0,001) em comparação aos Braford. Conclui-se que a hipoplasia testicular é a principal alteração associada à redução do perímetro escrotal, enquanto a vesiculite seminal apresentou maior ocorrência em Braford. Além disso, a superioridade dos touros Brangus quanto ao PE e qualidade seminal sugere diferenças raciais relevantes no processo de seleção genética dentro do rebanho analisado.

Palavras-chave: hipoplasia testicular, vesiculite seminal, Brangus, Braford, perímetro escrotal.

Autorizações legais: CEUA UFSM N° 1147090224

Scrotal circumference and disorders in Brangus and Braford bulls

Gilson Antônio Pessoa¹, Ana Paula Martini¹, Isadora Teixeira Souto¹, Emanuelli Zanon Gobbi¹, Emídio Ferreira Machado Filho²

¹Universidade Federal de Santa Maria, ²Reprobiovet Consultoria
E-mail: gilson.pessoa@ufsm.br

Scrotal circumference (SC) is one of the main indicators of reproductive potential in bulls, directly reflecting testicular development. This observational study was conducted in a genetic breeding herd of Brangus and Braford cattle located in the western border region of Rio Grande do Sul, Brazil, over a four-year period (2021–2025), evaluating bulls at 24 months of age. A total of 407 animals were subjected to breeding soundness examination, including Brangus (n=202) and Braford (n=205) bulls from contemporary groups. Statistical analysis was performed using SAS OnDemand through a linear model. The overall rate of reproductive unsuitability was 24.3% (99/407), with no difference between breeds (Braford: 24.4%, 50/205; Brangus: 24.2%, 49/202; P=0.72). The main cause of culling was failure in sexual behavior assessment, accounting for 13.5% (55/407) of cases, with no difference between genetic groups. A significant breed effect on SC was observed (P<0.001), with higher values in Brangus bulls (39.5 ± 1.5 cm) compared to Braford (35.6 ± 2.2 cm), considering only approved animals. There was also a progressive increase in SC over the years (P=0.0001), rising from 34.8 ± 1.3 cm in 2021 to 37.8 ± 1.4 cm in 2025. The prevalence of testicular hypoplasia was similar between breeds (Brangus: 4.9%; Braford: 5.3%; P>0.05). However, this condition had a significant effect on SC (P<0.001), with markedly lower values in affected animals (29.4 ± 2.5 cm) compared to normal bulls (36.8 ± 1.8 cm), confirming its impact on gonadal development. Seminal vesiculitis was more frequent in Braford bulls (12.5%, 26/205) compared to Brangus (3.9%, 15/202) (P=0.001). Additionally, Brangus bulls showed superior semen quality, with higher motility (86 ± 5.2% vs. 79 ± 2.2%; P=0.001) and a greater percentage of normal spermatozoa (81 ± 4% vs. 74 ± 3.2%; P=0.001) compared to Braford. In conclusion, testicular hypoplasia is the main condition associated with reduced scrotal circumference, while seminal vesiculitis showed higher occurrence in Braford bulls. Furthermore, the superior performance of Brangus bulls in terms of SC and semen quality suggests relevant breed differences in the genetic selection process within the evaluated herd.

Keywords: scrotal circumference, testicular hypoplasia, seminal vesiculitis, Brangus, Braford.

Legal authorizations: CEUA UFSM N° 1147090224

Peso ao nascimento como um indicador precoce do desenvolvimento testicular em touros Wagyu

Carla Alba¹, Dominike Prediger Delazeri¹, Juliana Trindade Novello¹, Silvio de Azeredo Girardi¹, Caetano Kaempf Farret¹, Janine de Camargo¹, Eraldo Zanella², Mariana Groke Marques^{2,3}, Renata Simões⁴, Ricardo Zanella¹

¹Universidade de Passo Fundo, ²Agropecuária Zanella, ³Embrapa Suínos e Aves, ⁴Universidade Federal do ABC
E-mail: 156648@upf.br

Apesar do destaque da raça Wagyu na produção de carne de alta qualidade, suas características reprodutivas ainda são pouco exploradas, especialmente no que se refere ao desenvolvimento testicular precoce e seus possíveis preditores. Nesse contexto, o peso ao nascimento (PN) surge como um potencial marcador precoce de desempenho reprodutivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre o PN e parâmetros de desenvolvimento testicular em machos da raça Wagyu. Foram avaliados 34 bezerros machos Wagyu puros, oriundos de um único rebanho, acompanhados do nascimento até a orquiectomia, realizada aproximadamente aos 200 dias de idade. Ao nascimento, os animais foram pesados em balança digital e identificados individualmente. Durante o período experimental, foram realizadas avaliações mensais de peso corporal (kg) e do estado sanitário, incluindo exame clínico geral e monitoramento rotineiro da saúde dos animais em sistema de criação extensivo. No momento da castração, foram mensurados o peso testicular total e as dimensões testiculares (comprimento e largura), bem como a largura escrotal, utilizando-se paquímetro de precisão. Amostras de tecido testicular (~2 mm³) foram coletadas do testículo direito, evitando a região do mediastino, fixadas em solução de Bouin por 24 h, transferidas para etanol 70% e processadas por técnicas histológicas padrão, incluindo desidratação, inclusão em parafina, microtomia e coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E). Para cada animal, cinco campos microscópicos foram analisados por meio de microscopia de luz acoplada a sistema de análise de imagem, permitindo a obtenção de medidas morfométricas dos túbulos seminíferos, incluindo diâmetro, altura epitelial e área do epitélio germinativo, como indicadores da atividade espermatogênica. Estatísticas descritivas (média ± desvio padrão) foram calculadas para todas as variáveis. As associações entre PN, idade e parâmetros testiculares foram avaliadas por correlação de Pearson, e modelos de regressão linear foram ajustados para investigar o efeito do PN sobre a área do epitélio germinativo, com ajuste avaliado pelo coeficiente de determinação (R²). O peso ao nascimento apresentou correlação positiva com a largura escrotal ($r = 0,67$; $P < 0,05$), peso testicular total ($r = 0,48$; $P < 0,01$) e área do epitélio germinativo ($43,68 \pm 22,75 \mu\text{m}^2$; $r = 0,36$; $P < 0,05$). A análise de regressão indicou que, para cada incremento de 1 kg no PN, houve aumento de $1,38 \mu\text{m}^2$ na área do epitélio germinativo ($R^2 = 0,128$), indicando associação de magnitude moderada, porém biologicamente relevante. Adicionalmente, a largura escrotal apresentou forte correlação com o peso testicular total ($119,02 \pm 81,96 \text{ g}$; $r = 0,76$; $P < 0,0001$) e com a área do epitélio germinativo ($r = 0,65$; $P < 0,0001$), reforçando seu potencial como marcador não invasivo da função espermatogênica. Os resultados demonstram que o PN está associado ao desenvolvimento testicular estrutural e funcional em bovinos Wagyu, sugerindo seu uso como indicador precoce na seleção de machos com maior potencial reprodutivo.

Palavras-chave: Wagyu, peso ao nascimento, desenvolvimento testicular, epitélio germinativo.

Autorizações legais: Animal Ethics Committee of the University of Passo Fundo (CEUA-002/2024)

Agradecimentos e financiadores: Agropecuária Zanella e à Associação Brasileira dos Criadores de Wagyu.

Birth Weight as an Early Indicator of Testicular Development in Wagyu Bulls

Carla Alba¹, Dominike Prediger Delazeri¹, Juliana Trindade Novello¹, Silvio de Azeredo Girardi¹, Caetano Kaempf Farret¹, Janine de Camargo¹, Eraldo Zanella², Mariana Groke Marques^{2,3}, Renata Simões⁴, Ricardo Zanella¹

¹Universidade de Passo Fundo, ²Agropecuária Zanella, ³Embrapa Suínos e Aves, ⁴Universidade Federal do ABC
E-mail: 156648@upf.br

Despite the prominence of the Wagyu breed in high-quality beef production, its reproductive characteristics remain poorly explored, particularly regarding early testicular development and its potential predictors. In this context, birth weight (BW) emerges as a potential early marker of reproductive performance. This study aimed to evaluate the association between BW and testicular development parameters in Wagyu males. A total of 34 purebred Wagyu male calves from a single herd were monitored from birth until orchietomy, performed approximately at 200 days of age. At birth, animals were weighed using a digital scale and individually identified. During the experimental period, monthly evaluations of body weight (kg) and health status were conducted, including clinical examination and routine herd health monitoring under an extensive grazing system. At castration, total testicular weight was recorded, and testicular dimensions (length and width) as well as scrotal width were measured using a precision caliper. Testicular volume was estimated based on morphometric measurements. Testicular tissue samples (~2 mm³) were collected from the right testis, avoiding the mediastinum region, fixed in Bouin's solution for 24 h, transferred to 70% ethanol, and processed using standard histological techniques, including dehydration, paraffin embedding, microtomy, and Hematoxylin and Eosin (H&E) staining. For each animal, five microscopic fields were analyzed using light microscopy coupled with an image analysis system to obtain morphometric measurements of seminiferous tubules, including diameter, epithelial height, and germinal epithelium area, as indicators of spermatogenic activity. Descriptive statistics (mean ± standard deviation) were calculated for all variables. Associations between BW, age, and testicular parameters were evaluated using Pearson's correlation coefficients, and linear regression models were fitted to assess the effect of BW on germinal epithelium area, with model fit assessed by the coefficient of determination (R²). Birth weight showed a positive correlation with scrotal width (r = 0.67; P < 0.05), total testicular weight (r = 0.48; P < 0.01), and germinal epithelium area (43.68 ± 22.75 μm²; r = 0.36; P < 0.05). Regression analysis indicated that for each 1 kg increase in BW, there was an increase of 1.38 μm² in germinal epithelium area (R² = 0.128), indicating a modest but biologically relevant association. Additionally, scrotal width showed a strong correlation with total testicular weight (119.02 ± 81.96 g; r = 0.76; P < 0.0001) and with germinal epithelium area (r = 0.65; P < 0.0001), reinforcing its potential as a non-invasive marker of spermatogenic function. These results demonstrate that BW is associated with structural and functional testicular development in Wagyu cattle, suggesting its use as an early indicator in the selection of males with greater reproductive potential.

Keywords: Wagyu, birth weight, testicular development, germinal epithelium.

Legal authorizations: Animal Ethics Committee of the University of Passo Fundo (CEUA-002/2024)

Acknowledgments and funders: Agropecuária Zanella and the Brazilian Association of Wagyu Cattle Breeders.

Qual o melhor método para diagnosticar leptospirose genital bovina (BGL) em touros assintomáticos em condições de campo?

Juliana de Souza Pedrosa¹, Daiany Eduarda Silva da Motta¹, Wilmara Rampinelli Reuter Gregg¹, André Luís Rios Rodrigues¹, Walter Lilenbaum¹

¹Universidade Federal Fluminense
E-mail: juliana_pedrosa@id.uff.br

A leptospirose bovina causa problemas reprodutivos significativos, como morte embrionária precoce com cio repetido, natimortos e infertilidade, levando a importantes perdas econômicas. Em fêmeas, leptospirosas já foram detectadas em diversos órgãos reprodutivos, como útero, ovários e complexos cumulus-oócitos. Em machos, foram detectadas no sêmen, epidídimo e ducto deferente de touros. A sorologia não consegue detectar portadores assintomáticos, que frequentemente são soronegativos ou apresentam baixos títulos de anticorpos. Recentemente, um estudo propôs um protocolo a campo a ser feito em duas etapas, consistindo em triagem do rebanho por sorologia seguida de detecção individual de portadores por PCR em amostras genitais de fêmeas, demonstrando resultados promissores para o diagnóstico de leptospirose genital bovina (BGL) em fêmeas. Embora o diagnóstico em fêmeas tenha avançado, a infecção genital em machos permanece pouco investigada, limitando a compreensão de seu papel na manutenção e disseminação da doença. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar o melhor método diagnóstico e a melhor amostra para a detecção de leptospirose genital bovina (BGL) em touros em condições de campo. Foram estudadas amostras genitais e de sangue coletadas de 37 touros não vacinados em condições de campo, provenientes de um único rebanho conhecido por apresentar baixo desempenho reprodutivo em vacas com 33,3% das vacas apresentando aborto e 44,4% apresentando morte embrionária. Amostras de sangue foram coletadas de todos os 37 touros para sorologia pelo teste de aglutinação microscópica (MAT). Adicionalmente, amostras de urina, sêmen e escova citológica do prepúcio foram obtidas de 32, 34 e 36 touros, respectivamente, para PCR para *lipL32*. A sorologia (MAT) mostrou baixa sorreatividade (13,5%), enquanto a PCR para *lipL32* detectou infecção genital em 80,5% dos touros. O DNA de *Leptospira* foi encontrado em 70,6% das amostras de sêmen, 50% do prepúcio e 46,8% da urina. A PCR foi significativamente mais sensível que a sorologia ($p < 0,05$), e as amostras genitais apresentaram melhor desempenho que a urina ($p < 0,05$), sem diferença entre o sêmen e prepúcio ($p > 0,05$). As análises estatísticas revelaram uma diferença significativa entre as amostras de origem genital e renal, demonstrando a superioridade das amostras genitais em comparação com as renais. Esse resultado também foi observado em um estudo que comparou amostras de urina e genitais para detectar portadores de leptospira em vacas naturalmente infectadas, mas nunca havia sido demonstrado em touros. Por outro lado, quando comparadas entre si, as amostras de sêmen e prepúcio não diferiram significativamente, indicando desempenho diagnóstico equivalente. Esses achados indicam que touros podem abrigar leptospirosas patogênicas e que a PCR em amostras genitais é o método mais adequado para o diagnóstico da Leptospirose Genital Bovina em touros assintomáticos. Para o diagnóstico da leptospirose genital bovina (BGL), a coleta de sêmen é uma conduta tendo em vista o aproveitamento na realização do andrológico. Em casos em que este não for realizado, a amostra prepucial constitui uma alternativa diagnóstica precisa. Ressalta-se que, embora os resultados atuais apresentem significância estatística, a ampliação da amostragem (N) é necessária para elevar o poder analítico do estudo. Dessa forma, os achados sugerem que o touro desempenha papel relevante na manutenção da BGL nos rebanhos, ressaltando a necessidade de investigações adicionais que permitam elucidar melhor os aspectos epidemiológicos, patogênicos e reprodutivos associados à infecção.

Palavras-chave: BGL, touros, diagnóstico, leptospirose, síndrome reprodutiva.

Autorizações legais: CEUA/UFF: 1711140524.

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem a Ana Luiza Borges pela ajuda na coleta das amostras em campo. As agências financiadoras Capes, FAPERJ e CNPq.

What is the best method for diagnosing bovine genital leptospirosis (BGL) in asymptomatic bulls under field conditions?

Juliana de Souza Pedrosa¹, Daiany Eduarda Silva da Motta¹, Wilmara Rampinelli Reuter Gregg¹, André Luís Rios Rodrigues¹, Walter Lilenbaum¹

¹Universidade Federal Fluminense
E-mail: juliana_pedrosa@id.uff.br

Bovine leptospirosis causes significant reproductive problems, such as early embryonic death with repeated estrus, stillbirths, and infertility, leading to important economic losses. In females, leptospire have been detected in various reproductive organs, such as the uterus, ovaries and cumulus-oocyte complexes. In males, they have been detected in the semen epididymis, and vas deferens of bulls. Serology cannot detect asymptomatic carriers, which are often seronegative or have low antibody titers. Recently, our group proposed a two-step field protocol consisting of herd screening by serology followed by individual carrier detection using PCR from female genital samples, showing promising results for diagnosing BGL in females. While diagnosis in females has advanced, genital infection in males remains poorly investigated, limiting understanding of their role in disease maintenance and spread. Therefore, this study aimed to identify the best diagnostic method and sample for detecting Bovine Genital Leptospirosis (BGL) in bulls under field conditions. We studied genital and blood samples collected from 37 unvaccinated bulls under field conditions, from one single herd known to present poor reproductive performance in cows with 33.3% of cows experiencing abortion and 44.4% experiencing embryonic death. Blood samples were collected from all 37 bulls for serology by the microscopic agglutination test (MAT). Additionally, urine, semen, and prepuce cytological brush were obtained from 32, 34, and 36 bulls, respectively, for *lipL32*-PCR. Serology (MAT) showed low seroreactivity (13.5%), whereas *lipL32*-PCR detected genital infection in 80.5% of bulls. *Leptospira* DNA was found in 70.6% of semen samples, 50% of preputial samples, and 46.8% of urine. PCR was significantly more sensitive than serology ($p < 0.05$), and genital samples performed better than urine ($p < 0.05$), with no difference between semen and preputial sample ($p > 0.05$). Statistics revealed a significant difference between samples of genital and renal origin, demonstrating superiority of genital samples compared to renal samples. This result was also observed in a study that compared urine and genital samples to detect leptospiral carriers in naturally infected cows but had never been demonstrated on bulls. Conversely, when compared to each other, semen and prepuce samples did not significantly differ, indicating equivalent diagnostic performance. These findings indicate that bulls can harbor pathogenic leptospire and that PCR on genital samples is the most suitable method for diagnosing Bovine Genital Leptospirosis in asymptomatic bulls. For the diagnosis of Bovine Genital Leptospirosis (BGL), semen collection is a procedure that should be prioritized, considering its usefulness in performing andrological examinations. In cases where these are not performed, preputial samples serve as a precise diagnostic alternative. It is noteworthy that, although current results show statistical significance, increasing the sample size (N) is necessary to enhance the study's analytical power. Thus, the findings suggest that the bull plays a relevant role in maintaining BGL in herds, highlighting the need for further investigations to better elucidate the epidemiological, pathogenic, and reproductive aspects associated with the infection.

Keywords: BGL, bulls, diagnosis, leptospirosis, reproductive syndrome.

Legal authorizations: CEUA/UFF: 1711140524.

Acknowledgments and funders: The authors thank Ana Luiza Borges for her help in collecting the samples in the field. The funding agencies are Capes, FAPERJ, and CNPq.

Recuperação da viabilidade espermática e tolerância à criopreservação em touro Nelore submetido à suplementação nutracêutica oral: um relato de caso estruturado na cronologia da espermatogênese

Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Pedro Henrique de Oliveira Baldini¹, Carla Patricia Teodoro de Carvalho², Nicoli de Oliveira Salandim², Gabriel Augusto Monteiro¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Seleon Biotecnologia
E-mail: rogerio.almeida@unesp.br

A subfertilidade em touros de central de inseminação artificial resulta em perdas econômicas e genéticas significativas, frequentemente caracterizadas pelo descarte de ejaculados que não atingem os padrões mínimos de motilidade a fresco para o processo de congelamento. O estresse oxidativo atua como um dos principais fatores deletérios à espermatogênese e à integridade da membrana plasmática espermática. Nesse contexto, a suplementação oral com antioxidantes, vitaminas e minerais desponta como uma estratégia terapêutica para proteger o epitélio seminífero. O objetivo deste trabalho é relatar a recuperação da viabilidade seminal de um touro Nelore submetido à suplementação nutracêutica, analisada sob a perspectiva cronológica da espermatogênese. Um reprodutor de 10 anos da raça Nelore, de rotina em central comercial (2 colheitas semanais), apresentava histórico recente de descartes de ejaculados por falha na cinética espermática inicial (< 80%). A análise da morfologia espermática em coletas prévias, já evidenciava quadros de baixa qualidade seminal, com registros atingindo até 24% de defeitos maiores. Em 07/02/2026 iniciou-se o tratamento oral com o complexo vitamínico e antioxidante Botumix Touro® (Botupharma®), composto principalmente por betacaroteno, L-carnitina, vitamina E, selênio e ômega-3. A suplementação (60 mL, SID) foi fornecida diretamente associada ao manejo nutricional que consistia em concentrado núcleo (0,25 kg/dia), ração (2 kg/dia), volumoso contendo silagem de milho e feno (20 kg/dia) e sal mineral ad libitum. Durante as semanas subsequentes, os ejaculados mantiveram o volume dentro do padrão racial (5,0 a 11,8 mL), porém continuaram sendo descartados pela falta de cinética. Aos 67 dias exatos de suplementação contínua (15/04/2026), observou-se a reversão do quadro clínico. A colheita gerou um ejaculado (volume 6,7 mL; concentração 900 x 10⁶ spz/mL) que atingiu a motilidade mínima exigida (≥80%). O sêmen foi processado (25 x 10⁶ células viáveis/dose) e obteve aprovação na avaliação pós-descongelamento, apresentando 40% de motilidade e vigor 3, resultando na produção de 257 doses comerciais. A análise morfológica realizada nas doses criopreservadas (pós-descongelamento) demonstrou excelente integridade estrutural, com apenas 10% de defeitos maiores e 11% de patologias totais. O intervalo de 67 dias para a recuperação funcional alinha-se perfeitamente à fisiologia bovina, correspondendo à duração total da espermatogênese somada ao trânsito epididimário (~61 dias + 8 a 14 dias). O presente relato sugere que a suplementação nutracêutica à base de antioxidantes e vitaminas apresentou associação clínica com a recuperação da qualidade seminal do reprodutor avaliado, indicando uma estratégia terapêutica viável na mitigação de falhas de cinética e criotolerância, viabilizando o retorno do animal à produção comercial.

Palavras-chave: andrologia, criopreservação, estresse oxidativo, nutracêuticos, sêmen bovino.

Autorizações legais: não aplicável.

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem à Seleon Biotecnologia e ST Genetics pela parceria e suporte, que foram fundamentais para a viabilização do estudo.

Sperm viability recovery and cryopreservation tolerance in a Nelore bull subjected to oral nutraceutical supplementation: a case report structured in the chronology of spermatogenesis.

Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Pedro Henrique de Oliveira Baldini¹, Carla Patricia Teodoro de Carvalho², Nicoli de Oliveira Salandim², Gabriel Augusto Monteiro¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Seleon Biotecnologia
E-mail: rogerio.almeida@unesp.br

Subfertility in bulls from artificial insemination centers results in significant economic and genetic losses, often defined by the discarding of ejaculates that do not meet the minimum motility standards for freezing. Oxidative stress acts as one of the main deleterious factors to spermatogenesis and the integrity of the sperm plasma membrane. In this context, oral supplementation with antioxidants, vitamins, and minerals emerges as a therapeutic strategy to protect the seminiferous epithelium. The objective of this work is to report the recovery of seminal predictability in a Nelore bull subjected to nutraceutical supplementation, proven from the chronological perspective of spermatogenesis. A Nelore breed bull, routinely used in a commercial center (2 weekly collections), had a recent history of ejaculate discards due to failure in initial sperm kinetics (< 80%). On July 2, 2026, daily oral treatment with the vitamin and antioxidant complex Botumix Touro® (Botupharma®) was initiated. During the following weeks, the ejaculates maintained a volume within the breed standard (5.0 to 11.8 mL), however, they were discarded due to lack of kinetics. At exactly 67 days of continuous supplementation (April 15, 2026), we encouraged a reversal of the clinical picture. The collection yielded one ejaculate (volume 6.7 mL; concentration 900×10^6 sperm/mL) that reached moderate minimum motility ($\geq 80\%$). The semen was processed (25×10^6 viable cells/dose) and passed the post-thaw evaluation, showing 40% motility and vigor 3, resulting in the production of 257 commercial doses. A morphological analysis performed on the cryopreserved doses (post-thaw) demonstrated excellent structural integrity, with only 10% major defects and 11% total pathologies. The 67-day interval for functional recovery aligns perfectly with bovine physiology, corresponding to the total duration of spermatogenesis plus epididymal transit (~61 days + 8 to 14 days). It is concluded that the components of Botumix Touro acted systemically in protecting germ cells from the basic phases of cell division, restoring spermatophysiology and ensuring structural cryotolerance and sperm motility.

Keywords: andrology, cryopreservation, oxidative stress, nutraceuticals, bovine semen.

Legal authorizations: no applicable.

Acknowledgments and funders: The authors thank Seleon Biotecnologia, and ST Genetics for their partnership and support, which were fundamental to making the study possible.

Relação da presença de pontos hiperecogênicos no parênquima testicular com o desenvolvimento reprodutivo em touros Nelore precoces e superprecoces

Dallet Amorim Paes Almeida¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Laura Nataly Garcia Oliveros¹, Gustavo Pagnan Pusch¹, Rubens Paes de Arruda¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: dalletapa@usp.br

A precocidade sexual em bovinos de corte é uma característica de grande interesse zootécnico, especialmente na raça Nelore (*Bos indicus*), amplamente utilizada nos sistemas produtivos brasileiros devido à sua elevada adaptabilidade, rusticidade e desempenho reprodutivo. A identificação precoce de animais com maior potencial reprodutivo é estratégica para programas de seleção. Nesse contexto, a ultrassonografia testicular destaca-se como uma importante ferramenta para avaliação do desenvolvimento reprodutivo, permitindo a análise detalhada do parênquima testicular, com foco na identificação, distribuição e caracterização de pontos hiperecogênicos. No entanto, ainda são escassos os estudos que associam esses achados ultrassonográficos à precocidade sexual em machos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação da presença de pontos hiperecogênicos no parênquima testicular com o desenvolvimento reprodutivo de touros Nelore classificados como superprecoces e precoces. Com base na idade à puberdade, definida por ejaculado apresentando 50×10^6 espermatozoides totais e pelo menos 10% de motilidade progressiva, 135 machos da raça Nelore foram classificados como superprecoces (puberdade ≤ 14 meses de idade) (N=91) ou precoces (puberdade entre 15 e 17 meses de idade) (N=44). Os animais foram submetidos mensalmente a avaliações ultrassonográficas testiculares (M5Vet – Mindray®) dos 10 aos 14 meses de idade. As imagens foram classificadas, quanto à presença de pontos hiperecogênicos, em escala ordinal de 0 a 3, sendo o escore 0, referente à ausência de pontos hiperecogênicos; escore 1, presença de até cinco pontos; escore 2, presença de mais de cinco pontos, predominantemente próximos ao mediastino testicular; e escore 3, presença de mais de cinco pontos distribuídos difusamente no parênquima testicular. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, com as médias comparadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, adotando-se nível de significância de 5%, utilizando o software JASP. Aos 10 meses, os touros precoces apresentaram maior escore de pontos hiperecogênicos ($1,04 \pm 0,11$) em comparação aos superprecoces ($0,41 \pm 0,06$; $p < 0,001$). Essa diferença se manteve até os 12 meses de idade. Aos 11 meses ($p < 0,001$), os valores observados foram de $0,88 \pm 0,13$ para os precoces e $0,32 \pm 0,06$ para os superprecoces. Aos 12 meses ($p = 0,001$), as médias foram de $0,78 \pm 0,14$ para os precoces e $0,29 \pm 0,06$ para os superprecoces. Com o avanço da idade, os escores foram similares para precoces e superprecoces, nos 13 ($0,49 \pm 0,12$ vs $0,35 \pm 0,07$; $p = 0,245$) e 14 meses ($0,35 \pm 0,09$ vs $0,22 \pm 0,05$; $p = 0,261$). Esses achados sugerem que com o desenvolvimento testicular, há redução da presença de pontos hiperecogênicos, caracterizado por padrões ultrassonográficos semelhantes entre os grupos, indicando convergência aos 13 meses de idade. Os resultados corroboram estudos que associam a maturação testicular à reorganização do parênquima e ao estabelecimento da atividade espermatogênica, sendo a presença de pontos hiperecogênicos associada às fases iniciais do desenvolvimento testicular, com redução progressiva à medida que ocorre a maturação reprodutiva.

Palavras-chave: ultrassonografia testicular, pontos hiperecogênicos, precocidade sexual, desenvolvimento reprodutivo.

Autorizações legais: CEUA/FZEA-USP Protocolo n. 9249180123 e CEUA/FMVZ-USP n. 265190525.

Agradecimentos e financiadores: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2023/01059-0) pelo apoio financeiro.

Relationship between the Presence of Hyperechoic Points in the Testicular Parenchyma and Reproductive Development in Early and Super-Early Nelore Bulls

Dallet Amorim Paes Almeida¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Laura Nataly Garcia Oliveros¹, Gustavo Pagnan Pusch¹, Rubens Paes de Arruda¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: dalletapa@usp.br

Sexual precocity in beef cattle is a trait of great zootechnical interest, especially in the Nelore breed (*Bos indicus*), which is widely used in Brazilian production systems due to its high adaptability, hardiness, and reproductive performance. The early identification of animals with greater reproductive potential is strategic for selection programs. In this context, testicular ultrasonography stands out as an important tool for evaluating reproductive development, allowing a detailed analysis of the testicular parenchyma, focusing on the identification, distribution, and characterization of hyperechoic points. However, studies associating these ultrasonographic findings with sexual precocity in males are still scarce. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship between the presence of hyperechoic points in the testicular parenchyma and the reproductive development of Nelore bulls classified as super-early and early. Based on age at puberty, defined as an ejaculate containing 50×10^6 total spermatozoa and at least 10% progressive motility, 135 Nelore males were classified as super-early (puberty ≤ 14 months of age) (N =91) or early (puberty between 15 and 17 months of age) (N =44). The animals were subjected to monthly testicular ultrasonographic evaluations (M5Vet – Mindray®) from 10 to 14 months of age. Images were classified according to the presence of hyperechoic points using an ordinal scale from 0 to 3: score 0, absence of hyperechoic points; score 1, presence of up to five points; score 2, presence of more than five points, predominantly near the testicular mediastinum; and score 3, presence of more than five points diffusely distributed throughout the testicular parenchyma. Comparisons between groups were performed using ANOVA, with means compared by the nonparametric Wilcoxon test, adopting a significance level of 5%, using JASP software. At 10 months of age, early bulls showed a higher hyperechoic point score (1.04 ± 0.11) compared to super-early bulls (0.41 ± 0.06 ; $p < 0.001$). This difference persisted up to 12 months of age. At 11 months ($p < 0.001$), the observed values were 0.88 ± 0.13 for early bulls and 0.32 ± 0.06 for super-early bulls. At 12 months ($p = 0.001$), the means were 0.78 ± 0.14 for early bulls and 0.29 ± 0.06 for super-early bulls. With advancing age, scores became similar between early and super-early bulls at 13 (0.49 ± 0.12 vs. 0.35 ± 0.07 ; $p = 0.245$) and 14 months (0.35 ± 0.09 vs. 0.22 ± 0.05 ; $p = 0.261$). These findings suggest that, with testicular development, there is a reduction in the presence of hyperechoic points, characterized by similar ultrasonographic patterns between groups, indicating convergence at 13 months of age. The results corroborate studies that associate testicular maturation with parenchymal reorganization and the establishment of spermatogenic activity, with the presence of hyperechoic points being associated with early stages of testicular development and progressively decreasing as reproductive maturation occurs.

Keywords: testicular ultrasonography, hyperechoic points, sexual precocity, reproductive development.

Legal authorizations: CEUA/FZEA-USP Protocol N. 9249180123 and CEUA/FMVZ-USP Protocol N. 265190525.

Acknowledgments and funders: The São Paulo Research Foundation (FAPESP, nº 2023/01059-0) for financial support.

Relação entre índices Doppler testiculares e parâmetros reprodutivos em touros Nelore

Mariana Teran Silva¹, Miller Pereira Palhão¹, Alexandra Albertina Oliveira², Giuliana Sales¹, Bárbara Azevedo Pereira Torres¹, Jairo Pereira Neves², Carlos Antônio de Carvalho Fernandes³, João Henrique Moreira Viana⁴, Karine Rabelo de Oliveira¹

¹Universidade Federal de Lavras, ²Universidade professor Edson Antônio Velano, ³Biotran Assessoria e Consultoria Medicina Veterinária,

⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

E-mail: marianateran.vet@gmail.com

A eficiência reprodutiva dos machos é um fator determinante na pecuária. A incorporação de ferramentas que avaliem aspectos funcionais, como a hemodinâmica testicular, pode representar um avanço importante na caracterização do potencial reprodutivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre parâmetros hemodinâmicos testiculares, variáveis biométricas, avaliações espermáticas e a concentração sérica de testosterona em touros Nelore. Foram avaliados 20 touros com idade entre 5 e 10 anos, no início da estação de monta. O fluxo sanguíneo testicular foi analisado por meio de ultrassonografia Doppler em duas regiões anatômicas: cordão espermático e porção intratesticular. Foram mensurados diâmetro arterial, índice de resistência (IR) e índice de pulsatilidade (IP). Realizou-se avaliações de biometria, sendo circunferência escrotal, comprimento testicular e consistência testicular. Além de avaliações espermáticas, incluindo vigor, motilidade e morfologia. A dosagem de testosterona foi realizada por radioimunoensaio. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R Core Team (v. 4.5.1). Foi conduzida uma Análise de Redundância (RDA) utilizando o pacote “vegan”. Para isolar os efeitos específicos em cada parâmetro reprodutivo, foram construídos modelos de regressão linear múltipla. Como resultado, observou-se redução significativa dos índices de resistividade (RI) ($0,44 \pm 0,10$ vs. $0,34 \pm 0,09$; $p < 0,0001$) e de pulsatilidade (PI) ($1,87 \pm 0,35$ vs. $1,49 \pm 0,27$; $p < 0,0001$) à medida que a artéria transita do cordão para o parênquima, confirmando o efeito de "amortecimento" (*damping effect*) necessário para a termorregulação. A análise de redundância (RDA) explicou 29,81% da variabilidade total, indicando associação positiva entre parâmetros biométricos (circunferência escrotal e comprimento e o diâmetro da artéria do cordão espermático), sugerindo que testículos maiores possuem maior aporte vascular. Não foi observada relação direta entre circunferência escrotal e concentração de testosterona. Destaca-se como principal achado a correlação inversa entre o índice de pulsatilidade intratesticular (ITA_PI) e a concentração de testosterona, confirmada por regressão linear múltipla ($p = 0,0317$; R^2 ajustado = 25,5%). Adicionalmente, a interpretação multivariada indicou tendência de associação positiva entre o índice de pulsatilidade e o total de defeitos espermáticos. Os resultados sugerem que a hemodinâmica testicular, especialmente o ITA_PI, possui potencial como marcador funcional da capacidade endócrina, podendo ser integrada ao exame andrológico de rotina para uma seleção mais precisa de touros. Conclui-se que a ultrassonografia Doppler representa uma ferramenta promissora para complementar a avaliação andrológica, fornecendo informações funcionais além dos parâmetros morfológicos tradicionais.

Palavras-chave: ultrassonografia doppler, índice de pulsatilidade, hemodinâmica testicular, andrologia, zebuínos.

Autorizações legais: (CEUA/Biotran: n°020/2024)

Agradecimentos e financiadores: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)
FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)

Relationship between testicular Doppler indices and reproductive parameters in Nelore bulls

Mariana Teran Silva¹, Miller Pereira Palhão¹, Alexandra Albertina Oliveira², Giuliana Sales¹, Bárbara Azevedo Pereira Torres¹, Jairo Pereira Neves², Carlos Antônio de Carvalho Fernandes³, João Henrique Moreira Viana⁴, Karine Rabelo de Oliveira¹

¹Universidade Federal de Lavras, ²Universidade professor Edson Antônio Velano, ³Biotran Assessoria e Consultoria Medicina Veterinária,

⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

E-mail: marianateran.vet@gmail.com

Reproductive efficiency in males is a determining factor in livestock production. The incorporation of tools that assess functional aspects, such as testicular hemodynamics, may represent an important advance in characterizing reproductive potential. The present study aimed to evaluate the relationship between testicular hemodynamic parameters, biometric variables, sperm evaluations, and serum testosterone concentration in Nelore bulls. Twenty bulls aged between 5 and 10 years were evaluated at the beginning of the breeding season. Testicular blood flow was analyzed using Doppler ultrasonography in two anatomical regions: the spermatic cord and the intratesticular portion. Arterial diameter, resistance index (RI), and pulsatility index (PI) were measured. Biometric evaluations were performed, including scrotal circumference, testicular length, and testicular consistency, in addition to sperm evaluations, including vigor, motility, and morphology. Testosterone levels were measured by radioimmunoassay. Statistical analyses were performed using R Core Team software (v. 4.5.1). A Redundancy Analysis (RDA) was conducted using the “vegan” package. To isolate the specific effects on each reproductive parameter, multiple linear regression models were constructed. As a result, a significant reduction in resistance index (RI) (0.44 ± 0.10 vs. 0.34 ± 0.09 ; $p < 0.0001$) and pulsatility index (PI) (1.87 ± 0.35 vs. 1.49 ± 0.27 ; $p < 0.0001$) was observed as the artery transitions from the spermatic cord to the parenchyma, confirming the “damping effect” required for thermoregulation. The redundancy analysis (RDA) explained 29.81% of the total variability, indicating a positive association between biometric parameters (scrotal circumference and length) and the diameter of the spermatic cord artery, suggesting that larger testes have greater vascular supply. No direct relationship was observed between scrotal circumference and testosterone concentration. The main finding was the inverse correlation between the intratesticular pulsatility index (ITA_PI) and testosterone concentration, confirmed by multiple linear regression ($p = 0.0317$; adjusted $R^2 = 25.5\%$). Additionally, multivariate interpretation indicated a tendency for a positive association between pulsatility index and total sperm defects. The results suggest that testicular hemodynamics, especially ITA_PI, has potential as a functional marker of endocrine capacity and may be integrated into routine andrological examinations for more precise bull selection. It is concluded that Doppler ultrasonography represents a promising tool to complement andrological evaluation, providing functional information beyond traditional morphological parameters.

Keywords: doppler ultrasonography, pulsatility index, testicular hemodynamics, andrology, Zebu cattle.

Legal authorizations: (CEUA/Biotran: n°020/2024)

Acknowledgments and funders: CNPq (National Council for Scientific and Technological Development)
FAPEMIG (The Research Support Foundation of the State of Minas Gerais)

Relação entre parâmetros cinéticos, funcionais e metabólicos espermáticos pós-descongelamento associados à fertilidade a campo de touros: resultados preliminares

Henrique Thomazo Frias¹, Ken Kawaoka Nagai², Roberta Ferreira Leite¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Luís Varela Brasileiro de Alcantara², Ester Lourdes Barros dos Santos², Pietro Sampaio Baruselli², André Maciel Crespilho³, Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ³Central Bela Vista
E-mail: hthomazo@gmail.com

A comercialização de sêmen congelado para o mercado nacional e para exportação é realizada a partir de centrais de coleta e processamento de sêmen. Fatores de qualidade seminal (motilidade total e progressiva, integridade de membranas e de DNA) e resistência espermática aos protocolos de criopreservação foram utilizados ao longo do tempo para a seleção de touros reprodutores, criando-se também padrões mínimos de qualidade para a comercialização dessas doses de sêmen. Porém, é possível que ejaculados de touros diferentes com atributos seminais semelhantes apresentem taxas de fertilidade distintas quando utilizadas em programas de inseminação artificial. Ao longo do trato reprodutivo da fêmea, os espermatozoides sofrem mudanças metabólicas e estruturais (hiperativação e capacitação), adquirindo os atributos necessários até sua chegada ao oviduto, onde ocorre a fertilização. A hiperativação e capacitação precoce dessas células pode ser uma consequência direta do processo de congelamento de sêmen (criocapacitação), resultando em menores taxas de fertilidade nesses ejaculados. A avaliação da motilidade por sistemas computadorizados permitiu a caracterização desses padrões de movimento, sendo possível observar e calcular a trajetória dessas células em estado de hiperativação (movimento flagelar vigoroso e assimétrico, com aumento da amplitude de movimento de cabeça). O objetivo do presente estudo foi comparar atributos cinéticos, funcionais e metabólicos de espermatozoides criopreservados de touros com diferentes índices de fertilidade previamente testados à campo, com a hipótese de que os touros de menor fertilidade apresentam maior número de células que sofrem capacitação precoce após o descongelamento. Para isso, foram descongeladas amostras de 13 touros com fertilidade a campo conhecida, separadas em dois grupos (Alta Fertilidade, >50% de fertilidade a campo com média de 57.68%, n = 7 e Baixa Fertilidade, <50% de fertilidade a campo com média de 45.65%, n = 6), mantidas a 37°C, sendo avaliadas em dois tempos (t=0h e t = 3h) quanto à cinética em ambiente anaeróbico (Ivos II, Hamilton Thorne Inc., USA), integridade de membranas plasmática e acrossomal (Eosina-Nigrosina e POPE), atividade mitocondrial através do teste citoquímico com 3'3 diaminobenzidina (DAB) e quanto à motilidade sustentada ao longo do tempo (3h/37°C) em ambiente anaeróbico (DynerScan Semen Analyser, Dyneval®) em lâminas Leja® vedadas com vaselina. Para variáveis paramétricas, foi realizado teste t para comparação de grupos e teste de Wilcoxon para variáveis não paramétricas, no software SAS for Windows 9.3, considerando o nível de significância $p \leq 0,05$. Touros de baixa fertilidade apresentaram menor tempo de motilidade sustentada, maior velocidade curvilínea (VCL) com menor linearidade e aumento de frequência de batimento cruzado (BCF) em t = 3h, apesar de terem maior velocidade média (CASA e DynerScan). No grupo de alta fertilidade, foi observada maior atividade mitocondrial (t = 0h e t = 3h) e maior motilidade progressiva (t = 0h). Não houve diferença entre os grupos na avaliação de integridade de membranas e na avaliação do CASA no t = 0h. Esses resultados preliminares indicam que a menor fertilidade dos ejaculados criopreservados podem estar relacionadas à capacitação precoce e consequente falha na chegada desses espermatozoides ao oviduto, diminuindo as chances de fertilização.

Palavras-chave: touros, criocapacitação, fertilidade, motilidade, metabolismo.

Autorizações legais: As amostras utilizadas foram doadas por central de coleta e processamento de sêmen

Agradecimentos e financiadores: À Dyneval® pela disponibilização do equipamento DynerScan e à Central Bela Vista Pecuária Ltda. pela doação das amostras criopreservadas.

Relationship between post-thaw sperm kinetic, functional, and metabolic parameters associated with field fertility in bulls: preliminary results

Henrique Thomazo Frias¹, Ken Kawaoka Nagai², Roberta Ferreira Leite¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Luís Varela Brasileiro de Alcantara², Ester Lourdes Barros dos Santos², Pietro Sampaio Baruselli², André Maciel Crespilho³, Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ³Central Bela Vista
 E-mail: hthomazo@gmail.com

The commercialization of frozen semen for the domestic market and for export is carried out from semen collection and processing centers. Seminal quality factors (total and progressive motility, membrane and DNA integrity) and sperm resistance to cryopreservation protocols have been used over time for the selection of breeding bulls, also creating minimum quality standards for the commercialization of these semen doses. However, it is possible that ejaculates from different bulls with similar seminal attributes present distinct fertility rates when used in artificial insemination programs. Throughout the female reproductive tract, spermatozoa undergo metabolic and structural changes (hyperactivation and capacitation), acquiring the necessary attributes until their arrival at the oviduct, where fertilization occurs. The premature hyperactivation and capacitation of these cells can be a direct consequence of the semen freezing process (cryocapacitation), resulting in lower fertility rates in these ejaculates. The evaluation of motility by computerized systems allowed the characterization of these movement patterns, making it possible to observe and calculate the trajectory of these cells in a state of hyperactivation (vigorous and asymmetrical flagellar movement, with an increase in the amplitude of head displacement). The objective of the present study was to compare kinetic, functional, and metabolic attributes of cryopreserved spermatozoa from bulls with different fertility indices previously field-tested, with the hypothesis that bulls of lower fertility present a higher number of cells that undergo premature capacitation after thawing. For this, samples from 13 bulls with known field fertility were thawed, separated into two groups (High Fertility, >50% field fertility with an average of 57.68%, n = 7 and Low Fertility, <50% field fertility with an average of 45.65%, n = 6), maintained at 37°C, and evaluated at two time points (t = 0h and t = 3h) regarding kinetics in an anaerobic environment (Ivos II, Hamilton Thorne Inc., USA), plasma and acrosomal membrane integrity (Eosin-Nigrosin and POPE), mitochondrial activity through the cytochemical test with 3'3 diaminobenzidine (DAB), and regarding sustained motility over time (3h/37°C) in an anaerobic environment (Dyनेscan Semen Analyser, Dyneval®) in Leja® slides sealed with vaseline. For parametric variables, a t-test was performed for group comparison and a Wilcoxon test for non-parametric variables, using SAS for Windows 9.3 software, considering a significance level of p ≤ 0.05. Low-fertility bulls presented shorter sustained motility time, higher curvilinear velocity (VCL) with lower linearity, and increased beat-cross frequency (BCF) at t = 3h, despite having higher average velocity (CASA and Dyनेscan). In the high-fertility group, higher mitochondrial activity (t = 0h and t = 3h) and higher progressive motility (t = 0h) were observed. There was no difference between the groups in the evaluation of membrane integrity and in the CASA evaluation at t = 0h. These preliminary results indicate that the lower fertility of cryopreserved ejaculates may be related to premature capacitation and the consequent failure in the arrival of these spermatozoa at the oviduct, decreasing the chances of fertilization.

Keywords: bulls, cryocapacitation, fertility, motility, metabolism.

Legal authorizations: The samples used were donated by a semen collection and processing center.

Acknowledgments and funders: To Dyneval® for providing the Dyनेscan equipment and to Central Bela Vista Pecuaria Ltda. for the donation of the cryopreserved samples.

Relação entre parâmetros seminais *in natura* e funcionalidade espermática pós-descongelamento de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*)

Lílian Katia Ximenes Silva¹, Alexandre Rossetto Garcia², Aluizio Otávio de Almeida Silva¹, Alysson Jorge de Oliveira Sousa³, Helbilena Gildeli Rodrigues Vasconcelos¹, Beatriz Lima Guerreiro¹, Sávio Lins Pimentel¹, Lucas Santos Carvalho¹, Francisco Shigeo Alves Nitta¹, José Silva de Sousa¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa, ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
E-mail: lilian.silva@ufpa.br

A integridade das membranas plasmática e acrossomal é de fundamental importância para a fertilização. Além disso, mudanças no potencial mitocondrial estão relacionadas à alteração da motilidade espermática. Objetivou-se analisar a relação entre parâmetros do sêmen *in natura* e a funcionalidade espermática pós-descongelamento de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*). O estudo foi conduzido na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), em Castanhal, Pará, Brasil. Cinco búfalos da raça Murrah (50,4±8,6 meses e 673,6±94,0 kg PV) foram submetidos quinzenalmente a onze coletas de sêmen pelo método da vagina artificial. Os ejaculados (n=55) foram avaliados quanto à motilidade progressiva (MP; %) e vigor (VIG; 1 a 5) em microscopia de contraste de fase (200×); viabilidade (VIAB, %) por meio da técnica de eosina-nigrosina (200 spz/amostra) em microscopia de campo claro (1000×); e defeitos espermáticos (DE; %) após diluição de 40 µL de sêmen em 1000 µL de solução de formalina (100 spz/amostra) em microscopia de contraste de fase (1000X). Para a criopreservação, o sêmen foi diluído em TES®, envasado e submetido à criopreservação. O sêmen descongelado (35 °C/30 segundos) foi separado por gradiente de Percoll para avaliação com sondas fluorescentes. Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada a 3 µL de Iodeto de Propídio (PI, 2 µg/mL) e 30 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL) para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, respectivamente. Outra amostra de 10 µL foi adicionada a 3 µL da 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, 153 µM) para análise do potencial mitocondrial. As amostras foram incubadas a 38,5 °C/10 minutos e, em seguida, submetidas à citometria de fluxo (BD FACSCanto II®), sendo avaliadas 10.000 células. A estatística foi realizada com o software Jamovi 2.7. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para testar normalidade e a estabilidade das amostras ao teste de Friedman. As correlações entre as variáveis foram determinadas pelo teste de Spearman, adotando-se nível de significância de 5%. Na avaliação do sêmen *in natura* observou-se que as médias se mantiveram dentro do padrão de normalidade aceitável para a espécie, sendo de 70,5±1,3%, 3,2±0,08, 70,9±1,7% e 16,0±1,4% para MP, VIG, VIAB e DE, respectivamente. Em relação a análise do sêmen após a criopreservação, foi constatada maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomo intactos (PI-/PSA-; 40,0±2,6%), seguido de células com membrana plasmática intacta e acrossomo lesado (PI-/PSA+; 23,5±2,5%), membrana plasmática e acrossomo lesados (PI+/PSA+; 22,4±1,9%) e membrana plasmática lesada e acrossomo intacto (PI+/PSA-; 14,1±1,8%). Ressalta-se que essas variáveis não sofreram oscilações significativas ($p>0,05$) durante o experimento, assim como o potencial mitocondrial (JC1 Alto, JC1 Médio e JC1 Baixo), sendo de 25,9±%1,3, 34,7±%1,9 e 39,3±2,0%, respectivamente. Sugere-se que a produção espermática contínua e sem variações pode estar relacionada às condições de manejo em que os bubalinos estavam submetidos às condições de manejo na Central. Não foi observada correlação significativa entre VIAB e PI-/PSA- ($p=0,85$), PI-/PSA+ ($p=0,83$), PI+/PSA+ ($p=0,91$), PI+/PSA- ($p=0,43$), e nem entre a MP com os diferentes padrões de JC1 (Alto: $p=0,16$; Médio: $p=0,18$ e Baixo: $p=0,75$). Conclui-se que a qualidade do sêmen *in natura* não garante a sobrevivência das células espermáticas após o processo de criopreservação. Além disso, constatou-se uma notável estabilidade dos parâmetros seminais de búfalos no período experimental e que as sondas fluorescentes detalham com precisão a integridade de membrana e a dinâmica energética mitocondrial de espermatozoides de búfalos.

Palavras-chave: espermatozoides, criopreservação, sondas fluorescentes, citometria de fluxo, bubalinocultura.

Autorizações legais: CEUA/CPATU 02/2015

Relationship between fresh seminal parameters and post-thaw sperm functionality in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*)

Lilian Katia Ximenes Silva¹, Alexandre Rossetto Garcia², Aluizio Otávio de Almeida Silva¹, Alysson Jorge de Oliveira Sousa³, Helbilena Gildeli Rodrigues Vasconcelos¹, Beatriz Lima Guerreiro¹, Sávio Lins Pimentel¹, Lucas Santos Carvalho¹, Francisco Shigeo Alves Nitta¹, José Silva de Sousa¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Embrapa, ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
E-mail: lilian.silva@ufpa.br

Plasma and acrosomal membrane integrity are essential for successful fertilization. In addition, changes in mitochondrial membrane potential are directly associated with alterations in sperm motility. This study aimed to evaluate the relationship between fresh semen parameters and post-thaw sperm functionality in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). The experiment was conducted at the Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), located in Castanhal, Pará, Brazil. Five Murrah buffalo bulls (50.4 ± 8.6 months old and 673.6 ± 94.0 kg body weight) were subjected to semen collection every two weeks, totaling eleven collections per animal, using the artificial vagina method. Ejaculates (n = 55) were evaluated for progressive motility (PM; %) and vigor (VIG; score 1 to 5) under phase-contrast microscopy (200×); viability (VIAB; %) using the eosin-nigrosin staining technique (200 sperm/sample) under bright-field microscopy (1000×); and sperm defects (SD; %) after dilution of 40 µL of semen in 1000 µL of formalin solution (100 sperm/sample) under phase-contrast microscopy (1000×). For cryopreservation, semen was diluted in TES®, packaged, and cryopreserved. Thawed semen (35°C/30 seconds) was separated using a Percoll gradient for fluorescent probe evaluation. A 10 µL semen aliquot was added to 3 µL of Propidium Iodide (PI, 2 µg/mL) and 30 µL of *Pisum sativum* agglutinin conjugated with Fluorescein Isothiocyanate (FITC-PSA, 100 µg/mL) to assess plasma membrane and acrosomal integrity, respectively. Another 10 µL aliquot was added to 3 µL of 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, 153 µM) for mitochondrial membrane potential analysis. Samples were incubated at 38.5°C for 10 minutes and then analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II®), with 10,000 cells evaluated per sample. Statistical analysis was performed using Jamovi 2.7 software. Data were subjected to the Shapiro-Wilk test for normality assessment and the Friedman test for sample stability. Correlations between variables were determined using Spearman's test, adopting a significance level of 5%. Fresh semen evaluation showed that mean values remained within the normal range considered acceptable for the species: 70.5 ± 1.3%, 3.2 ± 0.08, 70.9 ± 1.7%, and 16.0 ± 1.4% for PM, VIG, VIAB, and SD, respectively. Post-thaw semen analysis revealed a higher percentage of spermatozoa with intact plasma membrane and acrosome (PI-/PSA-; 40.0 ± 2.6%), followed by cells with intact plasma membrane and damaged acrosome (PI-/PSA+; 23.5 ± 2.5%), damaged plasma membrane and acrosome (PI+/PSA+; 22.4 ± 1.9%), and damaged plasma membrane with intact acrosome (PI+/PSA-; 14.1 ± 1.8%). These variables showed no significant variation (p > 0.05) throughout the experimental period, as well as mitochondrial membrane potential (High JC-1, Medium JC-1, and Low JC-1), with values of 25.9 ± 1.3%, 34.7 ± 1.9%, and 39.3 ± 2.0%, respectively. It is suggested that the continuous and stable sperm production may be associated with the management conditions to which the buffalo bulls were subjected at the center. No significant correlation was observed between VIAB and PI-/PSA- (p = 0.85), PI-/PSA+ (p = 0.83), PI+/PSA+ (p = 0.91), PI+/PSA- (p = 0.43), nor between PM and the different JC-1 patterns (High: p = 0.16; Medium: p = 0.18; Low: p = 0.75). It was concluded that fresh semen quality does not guarantee sperm cell survival after cryopreservation. Furthermore, a remarkable stability of seminal parameters in buffalo bulls was observed during the experimental period, and fluorescent probes provided accurate assessment of membrane integrity and mitochondrial energetic dynamics in buffalo spermatozoa.

Keywords: spermatozoa, cryopreservation, fluorescent probes, flow cytometry, buffalo production.

Legal authorizations: CEUA/CPATU 02/2015

Rotação testicular e qualidade seminal de touro da raça Nelore: Relato de Caso

Fernando Galvani¹

¹Laboratório Vet Plus

E-mail: galvani@vetplus.com.br

A crescente demanda por reprodutores bovinos, notadamente os zebuínos da raça Nelore, reforça a necessidade de seleção criteriosa de animais com elevado mérito genético e comprovada aptidão reprodutiva. Embora os programas de melhoramento genético tenham avançado significativamente por meio de avaliações baseadas em Diferenças Esperadas na Progenie (DEP) e genômica (DEPG), a confirmação da funcionalidade reprodutiva permanece dependente do exame andrológico. O objetivo deste estudo foi descrever e comparar o desempenho andrológico de um touro Nelore com rotação testicular estimada em 135°, em relação ao seu grupo contemporâneo. O grupo foi composto por 41 reprodutores, com idade média de $31,2 \pm 0,66$ meses, criados a pasto no norte do estado do Tocantins, sob suplementação nutricional básica. Os exames seguiram as recomendações do CBRA (2013), incluindo avaliação clínica, biometria testicular e análise seminal. O grupo contemporâneo apresentou: perímetro escrotal (PE) de 36,9 cm, volume testicular (VT) de 1202,3 mL, volume seminal (VOLs) de 3,8 mL, motilidade (MOT) de 69,6%, vigor de 4,7, concentração de $670 \times 10^6/\text{mL}$ e 6,6% de defeitos totais (DTT). O animal com rotação testicular apresentou: PE de 36,5 cm, VT de 1048,9 mL, VOLs de 7,8 mL, MOT de 70%, vigor 5, concentração de $730 \times 10^6/\text{mL}$ e 10% de DTT. E na avaliação clínica encontrou-se o cordão espermático íntegro, sem torção, testículo com boa consistência e boa mobilidade dentro da bolsa. Já o corpo do epidídimo se posicionou lateralmente seguindo a cauda. Os resultados demonstram que alterações morfológicas externas não necessariamente comprometem a espermatogênese, reforçando que a avaliação funcional deve ser prioritária no exame andrológico. Contudo, ressalta-se a necessidade de acompanhamento longitudinal, visto que o aumento do peso corporal e a senescência do reprodutor podem alterar mecanismos de termorregulação testicular e comprometer a produção espermática futura. Adicionalmente, deve-se considerar a possível etiologia genética desta variação morfológica e reitera-se, portanto, a imprescindibilidade do exame andrológico periódico, antes da estação de monta, como ferramenta fundamental para garantir o bom desempenho reprodutivo do animal.

Palavras-chave: andrologia, fertilidade, morfologia espermática, morfologia testicular, zebu.

Autorizações legais: não aplicável.

Testicular rotation and seminal quality of a Nelore bull: Case Report

Fernando Galvani¹

¹Laboratório Vet Plus

E-mail: galvani@vetplus.com.br

The increasing demand for cattle breeders, notably Nelore zebu breeds, highlights the importance of selecting animals with superior genetic merit and proven reproductive performance. Despite advances in genetic evaluations using Expected Progeny Differences (EPD) and genomic tools (gEPD), reproductive functionality still depends on andrological examination. This study aimed to describe and compare the andrological performance of a Nelore bull presenting a 135° testicular rotation with its contemporary group (n=41; 31.2 ± 0.66 months). Examinations followed CBRA (2013) guidelines, including clinical evaluation, testicular biometry, and semen analysis. The contemporary group presented: scrotal circumference of 36.9 cm, testicular volume of 1202.3 mL, semen volume of 3.8 mL, motility of 69.6%, vigor of 4.7, sperm concentration of 670 × 10⁶/mL, and 6.6% total defects. The rotated bull presented: scrotal circumference of 36.5 cm, testicular volume of 1048.9 mL, semen volume of 7.8 mL, motility of 70%, vigor 5, sperm concentration of 730 × 10⁶/mL, and 10% total defects. Clinical evaluation revealed an intact spermatid cord, without torsion, and a testicle with good consistency and mobility within the scrotum. The epididymal body was positioned laterally, following the tail. The results demonstrate that external morphological alterations do not necessarily compromise spermatogenesis, reinforcing that functional evaluation should be prioritized in the andrological examination. However, the need for longitudinal follow-up is emphasized, since increased body weight and senescence of the breeding bull can alter testicular thermoregulation mechanisms and compromise future sperm production. Additionally, the possible genetic etiology of this morphological variation should be considered, and therefore, the indispensability of periodic andrological examination before the breeding season is reiterated as a fundamental tool to ensure the animal's good reproductive performance.

Keywords: andrology, fertility, sperm morphology, testicular morphology, zebu.

Legal authorizations: no applicable.

Suplementação vitamínico-mineral pode influenciar a qualidade e perfil oxidativo do sêmen de touros?

**Mariana Karla Francolino da Silva¹, Álvaro de Miranda Alves², Luis Felipe Canela de Souza³, Larissa Araújo Stábile⁴,
Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção⁴, Marcilio Nichi², André Maciel Crespillo³**

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,

³Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil, ⁴Universidade de São Paulo

E-mail: marianakarlaf@gmail.com

A suplementação vitamínico-mineral tem sido amplamente utilizada em reprodutores de diversas espécies com o objetivo de melhorar a capacidade reprodutiva. No entanto, sua aplicação ainda ocorre de forma empírica, uma vez que os efeitos reais dessa suplementação sobre a qualidade espermática e o estresse oxidativo no sêmen de touros não estão completamente elucidados. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação vitamínico-mineral sobre a qualidade espermática e o perfil oxidativo do sêmen de touros. Para o estudo, foram selecionados 76 touros de diferentes raças (aptidão corte e leite; animais zebuínos [$n = 55$], taurinos [$n = 12$] e de raças compostas [$n = 9$]), com faixa etária entre 3 e 8 anos. Todos os animais se encontravam hípidos e em regime de coleta de sêmen em Central de Inseminação Artificial. Como critérios de inclusão, foram selecionados apenas reprodutores que apresentaram mínimo de 4 coletas de sêmen pré e 4 coletas após a aplicação da suplementação vitamínico-mineral (1 mL/100 kg de PV, via subcutânea, dose única) do produto Kit-Adaptador (Biogénesis Bagó®, Curitiba, Brasil), composto por vitamina A, E, Cobre, Zinco, Manganês e Selênio. Para avaliação dos efeitos da suplementação, foi considerada a média correspondente ao histórico dos 60 dias anteriores e posteriores à suplementação de motilidade total, vigor, concentração e morfologia espermática do sêmen fresco nos momentos pré e pós-administração. Adicionalmente, amostras de plasma seminal (PS) foram recuperadas através de centrifugação de cada ejaculado nos momentos 0 (imediatamente antes da suplementação) e 30 dias após a administração do produto. O PS foi congelado a -18°C para posterior avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados gerados foram analisados no software SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), sendo verificada a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Como as variáveis apresentaram distribuição paramétrica, empregou-se o “teste t” de Student pareado para comparar os momentos pré e pós-aplicação, considerando-se o efeito individual de cada touro, como também a análise estratificada por origem racial. Maior concentração espermática média por mL de sêmen foi mensurada no período pós aplicação quando avaliados todos os touros sem distinção de origem racial ($822,87 \pm 35,75$ vs. $910,88 \pm 34,96$ milhões/mL para os períodos pré e pós, respectivamente; $P = 0,01$). Da mesma forma, menor percentual de defeitos espermáticos totais foi contabilizado para o período pós aplicação ($28,14 \pm 0,65\%$) em comparação ao período pré ($30,27 \pm 0,90$; $P = 0,008$) quando a origem racial não foi considerada. Para os touros de origem zebuína, a suplementação vitamínico-mineral resultou em maior concentração espermática por mL ($849,39 \pm 42,90$ vs. $943,95 \pm 42,00$ milhões/mL; $P = 0,004$), menor percentual de defeitos menores ($8,11 \pm 0,29$ vs. $7,69 \pm 0,21$ %; $P = 0,05$) e de defeitos totais ($30,34 \pm 0,97$ vs. $27,85 \pm 0,70$; $P = 0,02$) para o período pós-aplicação. Para os touros de origem taurina e de raças compostas, observou-se tendência de aumento na concentração espermática média por mL ($685,73 \pm 97,34$ vs. $778,20 \pm 83,24$ milhões/mL para taurinos; $843,67 \pm 64,71$ vs. $885,74 \pm 86,38$ milhões/mL para compostos; $P = 0,07$). Verificou-se diminuição significativa da susceptibilidade ao estresse oxidativo após a suplementação, evidenciada pela redução dos níveis de TBARS ($76,67 \pm 6,22$ vs. $43,75 \pm 3,04$; $P < 0,0001$), independente da composição racial. Em conclusão, a suplementação vitamínico-mineral modulou parâmetros espermáticos e o perfil oxidativo do sêmen, com efeitos mais expressivos em animais zebuínos, indicando seu potencial como estratégia para promoção da saúde reprodutiva de touros.

Palavras-chave: qualidade espermática, estresse oxidativo, bovino, vitaminas, minerais, sêmen.

Autorizações legais: O presente estudo não envolveu procedimentos experimentais invasivos, intervenções diretas ou manipulações adicionais em animais que demandassem aprovação por Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Agradecimentos e financiadores: À Biogénesis Bagó (Curitiba, Brasil) e Central Bela Vista (Botucatu, Brasil).

Does vitamin–mineral supplementation influence the quality and oxidative profile of bull semen?

**Mariana Karla Francolino da Silva¹, Álvaro de Miranda Alves², Luis Felipe Canela de Souza³, Larissa Araújo Stábile⁴,
Mayra Elena Ortiz D'Àvila Assumpção⁴, Marcílio Nichi², André Maciel Crespillo³**

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ³Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil, ⁴Universidade de São Paulo
E-mail: marianakarlaf@gmail.com

Vitamin–mineral supplementation has been widely used in breeding males of various species with the aim of improving reproductive performance. However, its application is still largely empirical, as the actual effects of such supplementation on sperm quality and oxidative stress in bull semen are not fully understood. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of vitamin–mineral supplementation on sperm quality and the oxidative profile of bull semen. A total of 76 bulls from different breeds (beef and dairy aptitude; zebu [$n = 55$], taurine [$n = 12$], and composite breeds [$n = 9$]), aged between 3 and 8 years, were selected for the study. All animals were clinically healthy and maintained under semen collection in a central facility. As inclusion criteria, only sires with at least four semen collections before and four after vitamin–mineral supplementation were considered. The supplementation (1 mL/100 kg body weight, subcutaneous) consisted of the product Kit-Adaptador (Biogénesis Bagó®, Curitiba, Brazil), containing vitamins A and E, and the trace minerals copper, zinc, manganese, and selenium. To assess the effects of supplementation, the mean values of semen parameters recorded during the 60 days before and after treatment were considered, including total motility, vigor, concentration, and sperm morphology of fresh semen. Additionally, seminal plasma (SP) samples were obtained by centrifugation of each ejaculate at time 0 (immediately before supplementation) and 30 days after administration. The SP was stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent evaluation of susceptibility to oxidative stress through the quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Data were analyzed using SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Normality of residuals and homogeneity of variances were assessed prior to analysis. As the variables showed a parametric distribution, paired Student's t-test was used to compare pre- and post-supplementation periods, considering both the overall group and stratification by breed origin. The significance level was set at 5% ($P < 0.05$). A higher mean sperm concentration per mL was observed in the post-supplementation period when all bulls were analyzed regardless of breed origin (822.87 ± 35.75 vs. 910.88 ± 34.96 million/mL for pre and post periods, respectively; $P = 0.01$). Similarly, a lower percentage of total sperm defects was observed after supplementation ($28.14 \pm 0.65\%$) compared to the pre-treatment period ($30.27 \pm 0.90\%$; $P = 0.008$). In zebu bulls, vitamin–mineral supplementation resulted in higher sperm concentration per mL (849.39 ± 42.90 vs. 943.95 ± 42.00 million/mL; $P = 0.004$), as well as a lower percentage of minor defects (8.11 ± 0.29 vs. $7.69 \pm 0.21\%$; $P = 0.05$) and total defects (30.34 ± 0.97 vs. $27.85 \pm 0.70\%$; $P = 0.02$) in the post-supplementation period. For taurine and composite breed bulls, a trend toward increased mean sperm concentration per mL was observed (685.73 ± 97.34 vs. 778.20 ± 83.24 million/mL for taurine; 843.67 ± 64.71 vs. 885.74 ± 86.38 million/mL for composite; $P = 0.07$). A significant decrease in susceptibility to oxidative stress was observed after supplementation, as evidenced by the reduction in TBARS values (76.67 ± 6.22 vs. 43.75 ± 3.04 ; $P < 0.0001$). In conclusion, vitamin–mineral supplementation modulated sperm parameters and the oxidative profile of semen, with more pronounced effects in zebu bulls, indicating its potential as a complementary strategy to optimize male reproductive function.

Keywords: sperm quality, oxidative stress, vitamins, minerals, semen.

Legal authorizations: O presente estudo não envolveu procedimentos experimentais invasivos ou que implicassem em manipulação que demandasse aprovação por Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Acknowledgments and funders: Biogénesis Bagó (Curitiba, Brazil) and Central Bela Vista (Botucatu, Brazil).

Testículo Supranumerário (poliorquidismo): Relato de Caso

Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Karine Galhego Morelli¹, Leonardo David Pereira¹, Rubens Paes de Arruda¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: julianaportelafagundes@gmail.com

A poliorquidial é uma anomalia congênita caracterizada pela presença de testículo supranumerário. A ocorrência é rara, havendo escassez de relatos na literatura, especialmente daqueles com confirmação histológica do diagnóstico. Nos últimos anos, a ultrassonografia tem se destacado como ferramenta diagnóstica relevante, permitindo a identificação e a localização de testículos intra-abdominais. A etiologia mais aceita está relacionada à divisão transversal anômala da crista genital durante o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, o presente relato tem como objetivo descrever a ocorrência de um testículo supranumerário em um touro da raça Nelore. Durante o exame andrológico de 126 animais da raça Nelore, acompanhados longitudinalmente dos 10 aos 16 meses de idade, foi identificado um animal, aos 11 meses de idade, que à palpação revelou a presença de uma massa indolor, de consistência macia, localizada no lado esquerdo do escroto, próxima à região inguinoescrotal, sem sinais inflamatórios. No exame clínico reprodutivo, não foram observadas alterações no prepúcio e no pênis, e à palpação retal, não foram detectadas alterações nas glândulas sexuais acessórias. Para fins diagnósticos, realizou-se exame ultrassonográfico com equipamento portátil (M5-VET®, Shenzhen Mindray, China), equipado com transdutor linear, na frequência de 7,5MHz. A avaliação incluiu cortes ao longo de toda a extensão testicular, desde o plexo pampiniforme até as porções cranial, medial e ventral dos testículos direito e esquerdo. Ao exame, a estrutura identificada na palpação, encontrava-se próxima ao plexo pampiniforme esquerdo, se derivando do mesmo, apresentando discreta vascularização central, parênquima homogêneo, levemente anecoico e sem pontos hiperecogênicos, com dimensões iniciais de 27×40mm. Ao longo do acompanhamento, observou-se crescimento progressivo da estrutura: aos 14 meses, atingiu 33×45mm, idade na qual o animal alcançou a puberdade, definida pela presença de 50×10⁶ espermatozoides por ejaculado, com pelo menos 10% de motilidade progressiva, apresentando 88,5% de defeitos espermáticos totais, sendo 81,5% de defeitos maiores e 7% de defeitos menores, destacando principalmente, a gota citoplasmática proximal, a cauda fortemente enrolada ou dobrada e as alterações de peça intermediária, com perímetro escrotal (PE) de 26,2 cm e temperatura média da superfície escrotal (TMSE) de 36,9°C. Aos 15 meses, a massa apresentou dimensões de 45×45,1mm, com parâmetros espermáticos de 62,5×10⁶ espermatozoides/mL, 65% de motilidade, vigor 2 (1–5), com 75,5% de defeitos totais, sendo 67% de defeitos maiores e 8,5% de defeitos menores, PE de 27,2cm e TMSE de 35,25°C. Aos 16 meses, atingiu 55×45mm, com concentração espermática de 200×10⁶/mL, 35% de motilidade, vigor 2, com 54% de defeitos totais, sendo 47% de defeitos maiores e 7% de defeitos menores, PE de 28,1cm e TMSE de 33,85°C. Na literatura, o testículo supranumerário é frequentemente localizado no lado esquerdo do escroto. O diagnóstico diferencial da poliorquidial inclui diversas afecções escrotais, como espermatocele, hidrocele, varicocele e neoplasias testiculares malignas. Conclui-se que a poliorquidial tem sua etiologia e patogênese ainda não completamente compreendidas, mas os avanços nas técnicas de imagem permitem o seu diagnóstico, ainda que a confirmação definitiva permaneça dependente da avaliação histopatológica. Em uma população de 126 animais avaliados, a ocorrência de testículo supranumerário foi de 0,79%. Portanto, apesar da presença de um testículo supranumerário, o animal não apresentou evidências de evolução para neoplasias malignas durante o período avaliado e foi classificado como superprecoce, não sendo utilizado para reprodução, com presença de defeitos espermáticos que sugerem o incompleto desenvolvimento do epitélio epididimal.

Palavras-chave: testículo, triorquidismo, ultrassonografia, parênquima, congênito.

Autorizações legais: CEUA/FZEA-USP Protocolo n. 9249180123 e CEUA/FMVZ-USP Protocolo n. 265190525.

Agradecimentos e financiadores: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2023/01059-0) pelo apoio financeiro.

Supernumerary Testicle (polyorchidism): Case Report

Juliana Portela Gonçalves Fagundes¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Dallet Amorim Paes Almeida¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ellen Lara Miguel¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Karine Galhego Morelli¹, Leonardo David Pereira¹, Rubens Paes de Arruda¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
 E-mail: julianaportelafagundes@gmail.com

Polyorchidism is a congenital anomaly characterized by the presence of a supernumerary testicle. It is a rare occurrence, with few reports in the literature, especially those with histological confirmation of the diagnosis. In recent years, ultrasonography has become a relevant diagnostic tool, allowing the identification and localization of intra-abdominal testes. The most accepted etiology is related to the anomalous transverse division of the genital ridge during embryonic development. Therefore, this report aims to describe the occurrence of a supernumerary testicle in a Nelore bull. During the andrological examination of 126 Nelore bulls, followed longitudinally from 10 to 16 months of age, one animal was identified at 11 months of age. Palpation revealed the presence of a painless, soft mass located on the left side of the scrotum, near the inguinoscrotal region, without signs of inflammation. During the reproductive clinical examination, no alterations were observed in the prepuce and penis, and rectal palpation did not detect any alterations in the accessory sex glands. For diagnostic purposes, an ultrasound examination was performed using portable equipment (M5-VET®, Shenzhen Mindray, China), equipped with a linear transducer at a frequency of 7.5 MHz. The evaluation included cuts along the entire testicular length, from the pampiniform plexus to the cranial, medial, and ventral portions of the right and left testicles. Upon examination, the structure identified by palpation was located near the left pampiniform plexus, originating from it, presenting discrete central vascularization, homogeneous parenchyma, slightly anechoic and without hyperechoic points, with initial dimensions of 27×40 mm. Throughout the follow-up, progressive growth of the structure was observed: at 14 months, it reached 33×45mm, the age at which the animal reached puberty, defined by the presence of 50×10⁶ spermatozoa per ejaculate, with at least 10% progressive motility, presenting 88.5% total sperm defects, with 81.5% being major defects and 7% minor defects, highlighting mainly the proximal cytoplasmic droplet, the strongly coiled or folded tail, and the midpiece alterations, with a scrotal perimeter (SP) of 26.2 cm and an average scrotal surface temperature (ASST) of 36.9°C. At 15 months, the mass measured 45×45.1 mm, with sperm parameters of 62.5×10⁶ spermatozoa/mL, 65% motility, vigor 2 (1–5), with 75.5% total defects, of which 67% were major defects and 8.5% were minor defects, PE of 27.2 cm and ASST of 35.25°C. At 16 months, it reached 55×45 mm, with a sperm concentration of 200×10⁶/mL, 35% motility, vigor 2, with 54% total defects, of which 47% were major defects and 7% were minor defects, PE of 28.1 cm and ASST of 33.85°C. In literature, a supernumerary testicle is frequently found on the left side of the scrotum. The differential diagnosis of polyorchidism includes several scrotal conditions, such as spermatocele, hydrocele, varicocele, and malignant testicular neoplasms. It is concluded that the etiology and pathogenesis of polyorchidism are not yet fully understood, but advances in imaging techniques allow for its diagnosis, although definitive confirmation remains dependent on histopathological evaluation. In a population of 126 animals evaluated, the occurrence of supernumerary testicles was 0.79%. Therefore, despite the presence of a supernumerary testicle, the animal did not show evidence of progression to malignant neoplasms during the evaluated period and was classified as super-precocious, not being used for reproduction, with the presence of spermatic defects suggesting incomplete development of the epididymal epithelium.

Keywords: testicle, triorchidism, ultrasonography, parenchyma, congenital.

Legal authorizations: CEUA/FZEA-USP Protocol n. 9249180123 and CEUA/FMVZ-USP Protocol n. 265190525.

Acknowledgments and funders: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP, no. 2023/01059-0) for financial support.

Ultrassonografia do trato genital de touros Nelore jovens: análise exploratória por inteligência artificial

Renan Denadai^{1,2}, Antônio Galdino de Souza Júnior¹, João Guilherme Ernest Vieira Nóbrega¹, Eduardo Johnson Lopes Santos¹, Karina Poliana de Souza Reis¹, Kamile Ferreira dos Santos¹, Edgleyson Endlich da Silva Rocha¹, Giovanna Lenize Nazare Lobato¹, Fiana Sara Souza dos Santos¹

¹Universidade Federal de Roraima, ²Universidade Estadual Paulista
E-mail: renan.denadai@ufr.br

Alterações morfofuncionais do trato genital podem ser monitoradas por ultrassonografia durante o desenvolvimento de touros jovens. Este estudo teve como objetivo realizar uma análise exploratória de parâmetros ultrassonográficos do trato genital de touros Nelore jovens e investigar sua associação com idade (ID), peso corporal (PC) e perímetro escrotal (PE), bem como seu potencial de aplicação em modelos de inteligência artificial. Cinco touros Nelore foram avaliados em intervalos ~30 dias, dos 14 aos 17 meses. Em cada momento experimental, foram obtidas medidas de PC e PE, além de exames ultrassonográficos da próstata (PR), vesículas seminais (VS), epidídimos (EP), glândulas bulbouretrais (BU), parênquima (PA) e mediastino (ME) testiculares. Dos testículos, foram selecionados nove frames por avaliação, correspondentes às regiões proximal, média e distal, em três planos de incidência: longitudinal posterior, longitudinal lateral e transversal posterior. Em cada frame, foram analisadas quatro áreas de 50 × 50 pixels (1 cm = 60 pixels), duas proximais ao transdutor e duas distais, separadas pelo ME. Para cada EP e glândula sexual acessória, foi selecionado um frame com análise de toda a estrutura, excluindo-se as áreas ductais e, na PR, a uretra. As imagens foram processadas no ImageJ 1.54g, utilizando-se a intensidade de pixels para quantificação da ecogenicidade (ECOG) e o coeficiente de variação dos tons de cinza para avaliação da ecotextura (ECOT). As análises estatísticas foram realizadas no SAS® Enterprise Guide 8.3, mediante análise descritiva, com apresentação dos resultados em média ± erro-padrão, correspondentes ao valor global de cada estrutura, considerando-se o conjunto de frames analisados em cada ID. Foram ajustados modelos lineares mistos para medidas repetidas no tempo, considerando a ID como efeito fixo e o animal como efeito aleatório. As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey-Kramer ($\alpha = 0,05$). De forma exploratória, foram realizadas análises de correlação para medidas repetidas e análises multivariadas com algoritmo Random Forest, em Python 3.12.13, empregando os parâmetros ultrassonográficos como variáveis explicativas e ID, PC e PE como desfechos. O desempenho preditivo foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2). Para fins de síntese, são apresentados os valores médios observados nos momentos inicial e final do acompanhamento. Houve efeito da ID sobre a ECOG da PR ($115,8 \pm 0,9$ vs. $109,1 \pm 8,9$; $P < 0,01$), ECOG, ECOT e altura da VS ($94,6 \pm 3,0$ vs. $86,2 \pm 4,2$; $P = 0,02$; $0,22 \pm 0,01$ vs. $0,24 \pm 0,01$; $P < 0,01$; $1,38 \pm 0,06$ vs. $1,54 \pm 0,07$ cm; $P = 0,05$), ECOG do EP ($57,9 \pm 5,5$ vs. $45,2 \pm 2,4$; $P = 0,03$), altura das BU ($1,5 \pm 0,1$ vs. $1,7 \pm 0,1$ cm; $P = 0,01$), ECOG do ME ($131,2 \pm 2,5$ vs. $143,3 \pm 1,9$; $P < 0,01$) e ECOG do PA ($105,3 \pm 2,4$ vs. $118,6 \pm 1,5$; $P < 0,01$). A análise de correlação demonstrou forte associação entre ID e PC ($r = 0,92$; $P < 0,01$), ID e PE ($r = 0,90$; $P < 0,01$), e PC e PE ($r = 0,88$; $P < 0,01$). Entre os parâmetros ultrassonográficos, observaram-se correlações negativas da ECOG da PR com ID ($r = -0,73$; $P < 0,01$), PC ($r = -0,85$; $P < 0,01$) e PE ($r = -0,67$; $P = 0,01$), da ECOG da VS com ID ($r = -0,57$; $P < 0,01$), PC ($r = -0,45$; $P = 0,01$) e PE ($r = -0,42$; $P = 0,02$), e da ECOG do EP com ID ($r = -0,48$; $P = 0,01$), PC ($r = -0,44$; $P = 0,01$) e PE ($r = -0,52$; $P < 0,01$). Na análise multivariada, utilizando ECOG e altura da PR, ECOG e altura da VS e ECOG do EP como variáveis preditoras, o modelo Random Forest apresentou predição moderada para PC ($R^2 = 0,63$), limitada para ID ($R^2 = 0,11$) e inadequada para PE ($R^2 = -0,12$). Os achados sugerem que parâmetros ultrassonográficos do trato genital interno variam ao longo do desenvolvimento de touros jovens e apresentam associação com ID, PC e PE, com potencial preditivo moderado para PC. Estudos com maior número de animais e inclusão de parâmetros fisiológicos e andrológicos adicionais são necessários para validação dos achados.

Palavras-chave: próstata, vesícula seminal, ecogenicidade, aprendizado de máquina, maturação sexual.

Autorizações legais: Todas as atividades realizadas durante este estudo foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRR) da Universidade Federal de Roraima, protocolo nº 01/2026."

Ultrasonography of the genital tract in young Nellore bulls: an exploratory analysis using artificial intelligence

Renan Denadai^{1,2}, Antônio Galdino de Souza Júnior¹, João Guilherme Ernest Vieira Nóbrega¹, Eduardo Johnson Lopes Santos¹, Karina Poliana de Souza Reis¹, Kamile Ferreira dos Santos¹, Edgleyson Endlich da Silva Rocha¹, Giovanna Lenize Nazare Lobato¹, Fiana Sara Souza dos Santos¹

¹Universidade Federal de Roraima, ²Universidade Estadual Paulista
E-mail: renan.denadai@ufr.br

Morphofunctional changes in the genital tract can be monitored by ultrasonography during the development of young bulls. This study aimed to perform an exploratory analysis of ultrasonographic parameters of the genital tract of young Nellore bulls and to investigate their association with age, body weight (BW), and scrotal circumference (SC), as well as their potential application in artificial intelligence models. Five Nellore bulls were evaluated at ~30-day intervals, from 14 to 17 months. At each experimental time point, BW and SC measurements were obtained, in addition to ultrasonographic examinations of the prostate (PR), seminal vesicles (SV), epididymides (EP), bulbourethral glands (BU), testicular parenchyma (PA), and mediastinum testis (ME). From the testes, nine frames were selected per evaluation, corresponding to the proximal, middle, and distal regions, in three imaging planes: posterior longitudinal, lateral longitudinal, and posterior transverse. In each frame, four areas of 50 × 50 pixels (1 cm = 60 pixels) were analyzed, two proximal to the transducer and two distal, separated by the ME. For each EP and accessory sex gland, one frame was selected for analysis of the entire structure, excluding ductal areas and, in the PR, the urethra. Images were processed in ImageJ 1.54g, using pixel intensity to quantify echogenicity (ECOG) and the coefficient of variation of gray levels to assess echotexture (ECOT). Statistical analyses were performed in SAS® Enterprise Guide 8.3 using descriptive analysis, with results presented as mean ± standard error, corresponding to the overall value of each structure, considering the set of frames analyzed at each age. Linear mixed models for repeated measures over time were fitted, considering age as a fixed effect and animal as a random effect. Mean comparisons were performed using the Tukey-Kramer test ($\alpha = 0.05$). Exploratory repeated-measures correlation analyses and multivariate analyses using the Random Forest algorithm were performed in Python 3.12.13, using ultrasonographic parameters as explanatory variables and age, BW, and SC as outcomes. Predictive performance was evaluated by the coefficient of determination (R^2). For synthesis purposes, the mean values observed at the beginning and end of the follow-up are presented. There was an effect of age on PR ECOG (115.8 ± 0.9 vs. 109.1 ± 8.9 ; $P < 0.01$), SV ECOG, ECOT, and height (94.6 ± 3.0 vs. 86.2 ± 4.2 ; $P = 0.02$; 0.22 ± 0.01 vs. 0.24 ± 0.01 ; $P < 0.01$; 1.38 ± 0.06 vs. 1.54 ± 0.07 cm; $P = 0.05$), EP ECOG (57.9 ± 5.5 vs. 45.2 ± 2.4 ; $P = 0.03$), BU height (1.5 ± 0.1 vs. 1.7 ± 0.1 cm; $P = 0.01$), ME ECOG (131.2 ± 2.5 vs. 143.3 ± 1.9 ; $P < 0.01$), and PA ECOG (105.3 ± 2.4 vs. 118.6 ± 1.5 ; $P < 0.01$). Correlation analysis showed a strong association between age and BW ($r = 0.92$; $P < 0.01$), age and SC ($r = 0.90$; $P < 0.01$), and BW and SC ($r = 0.88$; $P < 0.01$). Among the ultrasonographic parameters, negative correlations were observed between PR ECOG and age ($r = -0.73$; $P < 0.01$), BW ($r = -0.85$; $P < 0.01$), and SC ($r = -0.67$; $P = 0.01$); between SV ECOG and age ($r = -0.57$; $P < 0.01$), BW ($r = -0.45$; $P = 0.01$), and SC ($r = -0.42$; $P = 0.02$); and between EP ECOG and age ($r = -0.48$; $P = 0.01$), BW ($r = -0.44$; $P = 0.01$), and SC ($r = -0.52$; $P < 0.01$). In the multivariate analysis, using PR ECOG and height, SV ECOG and height, and EP ECOG as predictive variables, the Random Forest model showed moderate prediction for BW ($R^2 = 0.63$), limited prediction for age ($R^2 = 0.11$), and inadequate prediction for SC ($R^2 = -0.12$). These findings suggest that ultrasonographic parameters of the internal genital tract vary throughout the development of young bulls and are associated with age, BW, and SC, with moderate predictive potential for BW. Studies with a larger number of animals and inclusion of additional physiological and andrological parameters are needed to validate these findings.

Keywords: prostate, seminal vesicle, echogenicity, machine learning, sexual maturation.

Legal authorizations: All activities carried out during this study were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA-UFRR) of the Federal University of Roraima, protocol n° 01/2026.

Uso de touros jovens com predição genômica de fertilidade associado a IATF em vacas da raça Holandesa.

Sebastião Inocêncio Guido¹, Leonardo Fernandes de Alencar², Fabiani Coutinho Lordão Guido², Carlos André Barbosa de Oliveira Filho², Júlio César Vieira de Oliveira², Antônio Santana Santos Filho²

¹Instituto Agronômico de Pernambuco, ²Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA
E-mail: sebastiao.guid@ipa.br

A monta controlada para repasse com touros ainda é amplamente utilizada em pequenos rebanhos leiteiros, inclusive naqueles com acesso à inseminação artificial. Nesse contexto, a associação da monta natural com a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) pode proporcionar ganhos em eficiência reprodutiva. No entanto, a taxa de prenhez decorrente do repasse com touros jovens de raças leiteiras nem sempre é mensurada. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o ganho na taxa de concepção com o uso de touros jovens da raça Holandesa, com bom potencial estimado de fertilidade, associados à IATF em vacas da mesma raça. O estudo foi conduzido na Estação Experimental de São Bento do Una (EESBU), pertencente ao IPA, localizada no município de São Bento do Una, região Agreste Central de Pernambuco, nas coordenadas 8°16'18" S e 36°27'59" O, altitude de 625 m e índice de temperatura e umidade (ITU) médio de 69,21 durante o período experimental. Foram utilizadas vacas cíclicas da raça Holandesa (n = 611), distribuídas em dois grupos experimentais (G1 e G2). As vacas de ambos os grupos foram submetidas a programas de IATF, em lotes de até 20 animais, ao longo de 36 meses. O G1 foi composto por vacas (n = 325) submetidas à IATF, seguidas de até dois serviços consecutivos nos estros de retorno. O G2 (n = 286) foi formado por vacas submetidas à IATF, seguida de monta natural com touro no primeiro estro de retorno. Foram utilizados touros jovens da raça Holandesa, com idade entre 14 e 16 meses, previamente avaliados por exame andrológico e com Índice de Fertilidade (IF) genômico variando de 0,20 a 0,40. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia em modo B, entre o 25º e o 30º dia após a IATF. Os dados foram analisados utilizando-se os procedimentos PROC FREQ e PROC LOGISTIC do software SAS (2026), com o objetivo de avaliar a eficiência dos grupos. A taxa de prenhez observada no Grupo 1 (G1) foi de 71,08% (231/325), distribuída em 52,00% na IATF, 14,76% no 1º estro de retorno e 4,30% no 2º estro de retorno. Já no Grupo 2 (G2), a taxa total foi de 69,23% (198/286), sendo 49,65% obtida na IATF e 19,58% por meio de monta controlada no 1º estro de retorno. A comparação entre os grupos, por meio do teste do qui-quadrado, não indicou diferença significativa entre eles ($\chi^2 = 0,26$; $p = 0,61$). Sendo O risco relativo estimado foi de 1,0267, indicando diferença discreta e não significativa entre os grupos. A análise por regressão logística também não evidenciou efeito significativo do tratamento sobre a probabilidade de prenhez ($p = 0,61$). O *odds ratio* estimado para o G2 em relação ao G1 foi de 0,91, sugerindo aproximadamente 9% menor chance de prenhez no G2; contudo, o intervalo de confiança (IC 95%: 0,65–1,29) confirmou a ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). Conclui-se que ambos os protocolos apresentam desempenho reprodutivo semelhante nas condições avaliadas. Ressalta-se que a escolha do método deve considerar aspectos práticos, operacionais e econômicos do sistema de produção.

Palavras-chave: bovino, touro, fertilidade, IATF, Holandês.

Autorizações legais: aprovado pela CEUA/IPA, protocolo 002/2023.

Use of young bulls with genomic fertility prediction associated with AI in Holstein cows.

Sebastião Inocêncio Guido¹, Leonardo Fernandes de Alencar², Fabiani Coutinho Lordão Guido², Carlos André Barbosa de Oliveira Filho², Júlio César Vieira de Oliveira², Antônio Santana Santos Filho²

¹Instituto Agronômico de Pernambuco, ²Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA
E-mail: sebastiao.guid@ipa.br

Controlled natural mating with bulls is still widely used in small dairy herds, including those with access to artificial insemination. In this context, the combination of natural mating with fixed-time artificial insemination (FTAI) can provide gains in reproductive efficiency. However, the pregnancy rate resulting from mating with young bulls of dairy breeds is not always measured. In this context, the present study aimed to evaluate the gain in conception rate with the use of young Holstein bulls, with good estimated fertility potential, associated with FTAI in cows of the same breed. The study was conducted at the São Bento do Una Experimental Station (EESBU), belonging to IPA, located in the municipality of São Bento do Una, Central Agreste region of Pernambuco, at coordinates 8°16'18" S and 36°27'59" W, altitude of 625 m and average temperature-humidity index (THI) of 69.21 during the experimental period. Holstein cows (n = 611) were used, distributed into two experimental groups (G1 and G2). Cows from both groups underwent timed artificial insemination (TAI) programs, in batches of up to 20 animals, over 36 months. G1 consisted of cows (n = 325) subjected to TAI, followed by up to two consecutive services during estrus return. G2 (n = 286) consisted of cows subjected to TAI, followed by natural mating with a bull during the first estrus return. Young Holstein bulls, aged between 14 and 16 months, previously evaluated by andrological examination and with a genomic Fertility Index (FI) ranging from 0.20 to 0.40, were used. Pregnancy diagnosis was performed by B-mode ultrasonography between the 25th and 30th day after TAI. The data were analyzed using the PROC FREQ and PROC LOGISTIC procedures of the SAS software (2026), with the aim of evaluating the efficiency of the groups. The pregnancy rate observed in Group 1 (G1) was 71.08% (231/325), distributed as follows: 52.00% in timed artificial insemination (TAI), 14.76% in the first estrus of return, and 4.30% in the second estrus of return. In Group 2 (G2), the total rate was 69.23% (198/286), with 49.65% obtained in TAI and 19.58% through controlled mating in the first estrus of return. The comparison between the groups, using the chi-square test, did not indicate a significant difference between them ($\chi^2 = 0.26$; $p = 0.61$). The estimated relative risk was 1.0267, indicating a slight and non-significant difference between the groups. Logistic regression analysis also did not show a significant effect of the treatment on the probability of pregnancy ($p = 0.61$). The estimated *odds ratio* for G2 compared to G1 was 0.91, suggesting approximately a 9% lower chance of pregnancy in G2; however, the confidence interval (95% CI: 0.65–1.29) confirmed the absence of a statistical difference ($p > 0.05$). It is concluded that both protocols show similar reproductive performance under the evaluated conditions. It is emphasized that the choice of method should consider practical, operational, and economic aspects of the production system.

Keywords: cattle, bull, fertility, TAI, Holstein.

Legal authorizations: Approved by CEUA/IPA, protocol 002/2023.